

Untersuchungen zur anti-DEC205-vermittelten
in vivo-Beladung dendritischer Zellen in der
Tumor-Immuntherapie

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Volker Storn
aus Niefern

im April 2008

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2004 bis März 2008 im Forschungslabor der Hautklinik des Universitätsklinikums Heidelberg (Laborleiter: PD Dr. rer. nat. Karsten Mahnke / Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Alexander H. Enk) angefertigt. Darüber hinaus wurden einzelne Experimente am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg, Abteilung Molekulare Immunologie (Abteilungsleiter: Prof. Dr. rer. nat. Günter J. Hämmerling) durchgeführt.

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Günter J. Hämmerling
PD Dr. rer. nat. Karsten Mahnke

Summary

One prerequisite for effective T cell activation is the uptake and presentation of antigens by dendritic cells. Among the different means of antigen uptake, i.e. pinocytosis, phagocytosis and receptor mediated endocytosis, the receptor mediated endocytosis via the antigen receptor DEC205 is most efficient. Antibodies against this receptor can be used to target dendritic cells *in vivo* and previous experiments have shown that subcutaneous vaccination of animals with tumor antigens chemically coupled to anti-DEC205 antibodies induced protective anti-tumor immunity. These experiments were carried out in transplantable B16 melanomas, but autochthonous tumors mimic the clinical situation better, as they grow spontaneously and slowly in affected animals. Therefore, the aim of this study was to test whether anti-DEC205 tumor antigen targeting can protect mice from tumor growth in the autochthonous tumor model RIP1-Tag5.

For DC-targeted immunization, the tumor antigen Tag protein was coupled to anti-DEC205 antibodies and the conjugates were initially tested in the RMA-Tag tumor model and the B16-Tag melanoma model. The Tag-transgenic RMA cells as well as the Tag-transgenic B16 melanoma cells were applied subcutaneously into the right flank of C57Bl/6 mice. After five to seven days the tumors were clearly visible and palpable and treatment of the mice was started thereafter. Hence, our model mimics a truly therapeutic situation.

In the first tumor experiments growth of RMA-Tag tumors could be slowed after anti-DEC205-Tag vaccination. Additional depletion of the regulatory T cells by anti-CD25 antibodies further improved the anti-tumor treatment. Here, up to 40% of the mice rejected the tumor. In the B16-Tag-melanoma model the tumor growth could be also slowed down after anti-DEC205-Tag vaccination. In contrast, additional depletion of the regulatory T cells had no effect on tumor growth.

Furthermore, tumor experiments with tumor bearing mice from the autochthonous tumor model RIP1-Tag5 were performed. Here, the combination of anti-DEC205-Tag immunization and systemic application of CpG provided a significant extension of life span of the mice.

In aggregate this work has shown that the DC-directed immunization using anti-DEC205-tumor antigen conjugates improved the treatment of established tumors compared to protein or peptide immunization alone. Moreover, the combination with other treatments, such as depletion of regulatory T cells or systemic activation of the vasculature using CpG oligonucleotides, could further improve the anti-tumor effects. Therefore, the anti-DEC205 conjugates are a universal tool in the therapeutic treatment of established tumors that may create synergistic effects with other anti-tumor therapies.

Zusammenfassung

Eine Voraussetzung für eine effektive T-Zell-Aktivierung ist die Aufnahme und die Präsentation von Antigenen durch dendritische Zellen. Unter den verschiedenen Möglichkeiten der Antigenaufnahme wie z.B. der Pinozytose, der Phagozytose oder der Rezeptor-vermittelten Aufnahme ist die Rezeptor-vermittelte Aufnahme über den Antigenrezeptor DEC205 die effektivste. Antikörper gegen diesen Rezeptor können Antigene *in vivo* zu den dendritischen Zellen leiten. Vorausgehende Experimente haben gezeigt, dass die subkutane Vakzinierung von Mäusen mit an anti-DEC205 gekoppelten Tumorantigenen eine schützende anti-Tumor-Immunität induziert. Diese Experimente wurden im transplantierbaren B16-Melanommodell durchgeführt. Autochthone Tumormodelle imitieren die klinische Situation jedoch wesentlich besser, da sie spontan und langsam in den betroffenen Tieren wachsen. Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit zu prüfen, ob Mäuse im autochthonen Tumormodell RIP1-Tag5 mit Hilfe DC-gerichteter Immunisierung mittels anti-DEC205-Konjugaten vor Tumoren geschützt werden können.

Um bei der Behandlung tumortragender Mäuse eine DC-gerichtete Immunisierung zu ermöglichen, wurde das Tumorantigen Tag-Protein an den anti-DEC205-Antikörper gekoppelt und in Initial-Experimenten in Transplantations-Tumormodellen, dem subkutanen RMA-Tag Tumormodell und dem B16-Tag-Melanommodell, getestet. Die Tag-transgenen RMA-Zellen sowie die Tag-transgenen B16-Melanomzellen wurden in die rechte Flanke von C57Bl/6-Mäusen subkutan appliziert. Nachdem nach fünf bis sieben Tagen die Tumoren gut sichtbar waren, wurde mit der Behandlung der Mäuse begonnen. Somit handelt es sich hier um einen echten therapeutischen Versuchsansatz.

In den ersten Tumorexperimenten konnte das Tumorwachstum von RMA-Tag-Tumoren nach anti-DEC205-Tag-Vakzinierung verlangsamt werden. Die zusätzliche Depletion der regulatorischen T-Zellen mit anti-CD25-Antikörper konnte die anti-Tumorbehandlung weiter verbessern. Dabei haben bis zu 40% der Mäuse den Tumor abgestoßen. Im B16-Tag-Melanommodell konnte das Tumorwachstum nach anti-DEC205-Tag-Gabe ebenfalls verlangsamt werden. Hier aber hatte die zusätzliche Depletion der regulatorischen T-Zellen keinen Effekt auf das Tumorwachstum.

Zudem wurden Tumorexperimente mit tumortragenden Mäusen des autochthonen Tumormodells RIP1-Tag5 durchgeführt. Bei der Behandlung dieser Mäuse konnte die Überlebensdauer deutlich verlängert werden, nachdem die anti-DEC205-Tag-Immunisierung mit der systemischen Gabe von CpG kombiniert wurde.

Anhand der durchgeführten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die DC-gerichtete Immunisierung mit anti-DEC205-Konjugaten die Behandlung etablierter Tumoren gegenüber der Protein- oder Peptid-Immunisierung verbessert. Darüber hinaus konnte die Kombination mit anderen Behandlungsmethoden, wie der Depletion regulatorischer T-Zellen oder der systemischen Gabe von CpG Oligonukleotiden, die anti-Tumorthherapie weiter verbessern. Somit sind anti-DEC205-Konjugate universell einsetzbare Werkzeuge in der therapeutischen Behandlung etablierter Tumoren, die möglicherweise Synergieeffekte mit anderen anti-Tumorthapien erzeugen.

Abkürzungen

Abs	Absorption
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
beta-Gal	beta-Galactosidase
BMDC	„bone marrow derived dendritic cell“
BSA	Bovines Serum Albumin
bp	Basenpaar
CD	„Cluster of Differentiation“
CFSE	Carboxy Fluorescein Succinimidyl Ester
CIP	„Calf Intestinal Phosphatase“
CpG ODN	Cytosin-phosphorothioat-Guanin Oligodesoxynukleotid
CRD	„Carbohydrate Recognition Domain“
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen-4
Da	Dalton
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DC	dendritische Zelle
DEC	dendritischer Endozytose-Rezeptor
dLN	drainierender Lymphknoten
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)
EAE	Experimentelle Autoimmun Encephalitis
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISPOT	„Enzyme Linked Immuno Spot“
FACS	„Fluorescence activated Cell Sorting“
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FoxP3	„Forkhead box P3“
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor

gp100	Glykoprotein 100 kDa
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethansulfonsäure
HER-2	Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor Nummer 2
HRPO	„Horse Radish Peroxidase“
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kb	Kilobase
KIV	„kill <i>in vivo</i> “
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	„Magnetic Cell Sorting“
MART-1	Melanom-Antigen reaktiv mit T-Zellen
MDSC	„Myeloid derived Suppressor Cell“
2-MEA	beta-Mercaptoethylamin
Melan-A	Melanom-Antigen A
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	„Major Histocompatibility Complex“
MMR	Makrophagen-Mannose-Rezeptor
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MPBH	„4-(4- <i>N</i> -Maleimidophenyl)Butyric Acid Hydrazide Hydrochloride“
MWCO	„Molecular Weight Cut Off“
MyD88	„Myeloid Differentiation Protein 88“
NF- κ B	„Nuklear Factor κ B“
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin

PerCP-Cy5.5	Peridin-Chlorophyll-Protein-Cyanin5.5
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidium-Iodid
poly I:C	Polyinosin:Polycytidyl-Säure
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RGS-5	„Regulator of G-Protein Signaling-5“
RIP	Ratten-Insulin-Promotor
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
SA	Streptavidin
s.c.	subkutan
ScFv	„Single chain Fragment variable“
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH	Sulfhydryl
SOC	„Salt-optimized + Carbon“
Sulfo-SMCC	„Sulfosuccinimidyl 4-(<i>N</i> -Maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate“
SV40	Simian Virus 40
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAP	„Transporter associated with Antigen Processing“
Tag	„Large T Antigen“
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCR	T-Zellrezeptor
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TIR	Toll-Interleukin 1 Rezeptor
TIRAP	„TIR domain-containing Adaptor Protein“
TLR	Toll-Like-Rezeptor
tRNA	Transfer-RNA
TRIF	„TIR domain-containing Adaptor inducing IFN-beta“
TRP-2	„Tyrosinase-related Protein-2“
U/min	Umdrehungen pro Minute
VEGF	„Vascular Endothelial Growth Factor“

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	17
1.1	Behandlung von Tumoren und Tumormodellen	17
1.2	Dendritische Zellen und der Antigen-Rezeptor DEC205	24
1.3	Ziel der Arbeit	30
2	Materialien und Methoden	31
2.1	Biochemische Methoden	31
2.1.1	Chemikalien	31
2.1.2	Antikörperaufreinigung	31
2.1.2.1	Aufreinigung des monoklonalen anti-DEC205-Antikörpers	31
2.1.2.2	Aufreinigung des monoklonalen anti-CD25-Antikörpers	32
2.1.3	Herstellung der Antikörper-Konjugate	32
2.1.3.1	Kopplung unter Verwendung des Crosslinkers MPBH	33
2.1.3.2	Kopplung nach Blockieren der Sulfhydryl-Gruppen des Proteins	34
2.1.3.3	Kopplung unter Verwendung des Crosslinkers Sulfo-SMCC	35
2.1.4	Analyse der Reaktivität der NHS-Ester	36
2.1.5	Ellman-Test	36
2.1.5.1	Quantifizierung der reduzierten Sulfhydryl-Gruppen	36
2.1.5.2	Quantifizierung der reaktiven Maleimidgruppen	37
2.1.6	SDS PAGE und Western Blot	37
2.1.7	Untersuchung der Bindung der Konjugate	38
2.1.7.1	Bindung der Konjugate an Milzzellen	38
2.1.7.2	Bindung der Konjugate auf Lymphknotenschnitten	39
2.2	Zellkulturtechnische Materialien und Methoden	40
2.2.1	Medien	40
2.2.2	Plastikwaren	40
2.2.3	Kryokonservierung von Zellen	40
2.2.4	Zelllinien	40
2.2.4.1	Hybridomzelllinie für den monoklonalen anti-DEC205-Antikörper	40
2.2.4.2	Hybridomzelllinie für den monoklonalen anti-CD25-Antikörper	41
2.2.4.3	Kultur der GM-CSF produzierende Zelllinie	41
2.2.5	Durchflusszytometrie	42
2.2.6	ELISPOT	42
2.2.6.1	Isolation der Milzzellen	43
2.2.6.2	Restimulierung der Milzzellen	43
2.2.6.3	Detektion der Interferon-gamma-Produktion	43
2.2.7	Generierung von dendritischen Zellen aus Knochenmark	44
2.3	Tierexperimentelle Methoden	45
2.3.1	Mäuse	45
2.3.2	Analyse der Aktivität der zytotoxischen T-Zellen <i>in vivo</i>	45

2.3.2.1	Beladung und Injektion der Zellen	45
2.3.2.2	Analyse des spezifischen „Kills“	46
2.3.3	Untersuchung der Proliferation <i>in vivo</i>	46
2.3.3.1	T-Zell-Transfer und Immunisierung	47
2.3.3.2	Bestimmung der Proliferation und der Interferon-gamma-Expression	48
2.3.4	Tumormodelle	48
2.3.4.1	Subkutaner RMA-Tag-Tumor	48
2.3.4.2	Subkutaner B16-Tag-Tumor	49
2.3.4.3	Subkutaner BMT9-Tag-Tumor	49
2.3.4.4	Autochthones RIP1-Tag5-Tumormodell	49
2.3.5	Vakzinierung tumortragender Mäuse	50
2.3.6	Depletion der regulatorischen T-Zellen	50
2.3.7	Isolierung von Zellen aus dem Tumorgewebe	50
2.3.8	Behandlung der autochthonen Tumoren	51
2.4	Molekularbiologische Methoden	52
2.4.1	Klonierung der ScFv-Fusionsantikörper	52
2.4.2	Isolierung der RNA aus Hybridomzellen	52
2.4.3	Reverse Transkription	53
2.4.4	PCR zur Generierung der Variablen Regionen	53
2.4.5	Restriktionsverdau	53
2.4.6	Agarosegel-Elektrophorese	54
2.4.7	DNA-Aufreinigung aus dem Agarosegel	54
2.4.8	Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA	54
2.4.9	Dephosphorylierung von Vektoren	55
2.4.10	Ligation	55
2.4.11	Klonierung über Adenin-Überhänge	55
2.4.12	Transformation	56
2.4.13	PCR zur Analyse von Plasmiden	57
2.4.14	Mini-Präparation zur Plasmid-DNA-Isolation	57
2.4.15	Maxi-Präparation zur Plasmid-DNA-Isolation	58
2.4.16	DNA-Aufreinigung	58
2.4.17	DNA-Sequenzierung	58
3	Ergebnisse	59
3.1	Herstellung der Antikörper-Konjugate	59
3.1.1	Verwendung des Crosslinkers MPBH	60
3.1.2	Blockieren der Sulfhydryl-Gruppen mit N-Ethylmaleimid	61
3.1.3	Verwendung des Crosslinkers Sulfo-SMCC	62
3.1.3.1	Herstellung der Protein-Antikörper-Konjugate	63
3.1.3.2	Herstellung der Peptid-Antikörper-Konjugate	65
3.1.4	Bindung der Konjugate	67
3.1.4.1	Bindung der Konjugate <i>in vitro</i>	67

3.1.4.2	Bindung der Konjugate auf Lymphknotenschnitten	69
3.1.5	Immunogenität der Antikörper-Konjugate	69
3.1.5.1	Induktion antigenspezifischer „Kill“-Aktivität <i>in vivo</i>	70
3.1.5.2	Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort nach Immunisierung mit anti-DEC205-Konjugaten	73
3.1.5.3	Proliferation <i>in vivo</i> nach anti-DEC205-Tag-Behandlung	75
3.2	Tumorexperimente	78
3.2.1	Transplantierbare Tumormodelle	78
3.2.1.1	Aktivierung der dendritischen Zellen	78
3.2.1.2	Verzögerung des Wachstums von RMA-Tag-Tumoren nach Peptid-Konjugat-Behandlung	80
3.2.1.3	Verzögerung des Wachstums von RMA-Tag-Tumoren nach anti-DEC205-Tag-Behandlung	81
3.2.1.4	Verbesserte Überlebensdauer RMA-Tag-Tumor tragender Mäuse nach fortlaufender Behandlung mit anti-DEC205-Tag	83
3.2.1.5	Synergie von anti-DEC205-Tag-Behandlung und der Depletion der regulatorischen T-Zellen bei RMA-Tag-Tumor tragenden Mäusen	85
3.2.1.6	Depletion der regulatorischen T-Zellen in B16-Tag-Tumor tragenden Mäusen	89
3.2.1.7	Verteilung der regulatorischen T-Zellen in den unterschiedlichen Organen verschiedener Tumormodelle	91
3.2.2	Verlängerte Überlebensdauer von tumortragenden RIP1-Tag5-Mäusen nach anti-DEC205-Tag-Behandlung	93
3.3	Klonierung der ScFv-Fusionsantikörper	95
3.3.1	Klonierung der variablen Regionen	95
3.3.2	Klonierung der Tag-Sequenz für die Fusionsantikörper	97
4	Diskussion	101
4.1	DC-gerichtete Immunisierung in der anti-Tumorthherapie	101
4.2	Kombination verschiedener Therapien	106
4.3	Konjugate und Fusionsantikörper	111
4.4	Schlussfolgerung	115
5	Anhang	117
6	Literaturverzeichnis	119

1 Einleitung

1.1 Behandlung von Tumoren und Tumormodellen

Krebserkrankungen gehören mit zu den häufigsten Todesursachen. Sie können in verschiedensten Organen und Geweben durch Veränderungen und Mutationen entstehen, die zu unkontrolliertem Wachstum von Zellen führen. Diese Tumoren befallen und verdrängen lebenswichtige Organe, was häufig zum Tode führt. Prinzipiell sind Personen aller Altersgruppen vom Tumorwachstum betroffen, wobei die Gefahr an Krebs zu erkranken mit dem Alter zunimmt. Äußere Einflüsse wie z.B. UV-Strahlung, aber auch eine erblich-bedingte Vorbelastung, können zum Entstehen der Krankheit beitragen. Bei den meisten Krebsarten ist die Akkumulation mehrerer Mutationen in bestimmten Zellen notwendig, um den kontrollierten Zellzyklus zu überwinden und ein unkontrolliertes Wachstum der Zellen zu erreichen. Haben sich die Veränderungen in den Zellen manifestiert, führt dies meist zur Entstehung von Tumoren.

Der Krankheitsverlauf wird in mehrere klinische Stufen unterteilt, die am Beispiel des Melanoms im Folgenden dargestellt sind. Bei der Stufe 0 sind abnormale Zellen in der oberen Hautschicht zu finden, die jedoch die unteren Hautschichten noch nicht befallen haben. Befindet sich der Tumor in der oberen Hautschicht, der Epidermis und/oder im oberen Bereich der unteren Hautschicht, der Dermis, so hat der Tumor Stufe 1 erreicht. Dabei ist das Melanom nicht dicker als 1,5 mm und umliegende Lymphknoten sind noch nicht befallen. Ein Stufe 2 - Melanom hat bereits eine Dicke von 1,5 - 4 mm und hat sich zudem bereits im unteren Bereich der Dermis ausgebreitet. Das darunter liegende Gewebe und die umliegenden Lymphknoten sind noch nicht befallen. Hat das Melanom Stufe 3 erreicht, können darunter liegendes oder nahegelegenes Gewebe oder nahegelegene Lymphknoten befallen sein. Wenn die Stufe 4 erreicht ist, sind bereits weit vom Primärtumor entfernte Lymphknoten und Organe mit Metastasen befallen. In einem solchen Fall sind die Heilungschancen zunehmend gering.^{1,2}

Bei frühem Erkennen sind die Heilungschancen hingegen sehr gut.³ Hier konnten in den letzten Jahren gute Fortschritte in der Behandlung von Tumoren erzielt werden. Jedoch weisen viele Behandlungsmethoden immer noch ein sehr breites

Nebenwirkungsspektrum auf. Die älteste, aber sicherlich weiterhin unverzichtbare Methode ist die operative Entfernung. Sichtbare Tumoren, gerade im Falle eines Melanoms, können durch Excision entfernt werden. Zunehmend schwieriger wird es jedoch, wenn innere, lebenswichtige Organe mit Metastasen befallen sind. Kleinere Metastasen, die nicht erkennbar sind, lassen sich dementsprechend nicht operativ entfernen, weshalb häufig zusätzlich zur Operation eine Chemotherapie durchgeführt wird.

Bei der Chemotherapie werden chemische Stoffe, sogenannte Zytostatika, verabreicht, die ein Absterben von sich schnell teilenden Zellen bewirken. Dabei werden jedoch nicht nur die sich schnell teilenden Tumorzellen angegriffen, sondern auch andere Zellen, die eine hohe Teilungsfrequenz aufweisen, was u.a. zu Haarausfall, aber auch zur Schädigung verschiedener Schleimhäute z.B. im Magen-Darm-Trakt führt. Diese Chemotherapeutika wirken jedoch nicht immer, zumal der Tumor oftmals nach kurzer Zeit resistent wird und der Patient nicht mehr auf die Therapie anspricht.^{4, 5}

Die Strahlentherapie ist eine weitere Behandlungsmethode, die häufig in Kombination mit einer Chemotherapie,⁶ aber auch vorbereitend auf eine Operation durchgeführt wird.⁷ Bei der Strahlentherapie werden die Tumoren ionisierender Strahlung ausgesetzt, was zu einem Absterben der Tumorzellen führt. Hierbei ist es besonders wichtig, zuvor die Größe und Lage des Tumors z.B. mit Hilfe der Tomographie genau zu bestimmen, um die Schädigung des umliegenden Gewebes möglichst zu minimieren. Ein Nachteil der lokal angewendeten Radiotherapie ist jedoch, dass weiter entfernt liegende Metastasen oder noch unentdeckte Sekundärtumoren von dieser Behandlung unberührt bleiben.⁸

In den letzten Jahren rücken zunehmend immunologische Methoden in den Vordergrund. So z.B. auch die Anwendung des in den letzten Jahren zugelassenen monoklonalen Antikörpers Trastuzumab (Herzeptin®). Dieser bindet an HER-2 (Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor Nummer 2),⁹ der besonders auf schnell wachsenden Mammakarzinomzellen stark exprimiert ist.¹⁰ Durch die Bindung des Antikörpers wird der Rezeptor des Wachstumsfaktors blockiert. Damit wird der Signalweg unterbrochen, was zu einer Blockade der Zellproliferation führt und so das Wachstum des Tumors hemmt. Die Antikörpertherapie wird vor allem bei metastasierenden Mammakarzinomen¹¹ u.a. in Kombination mit einer Chemo-

therapie angewendet.¹² Trastuzumab wird auch nach Operationen und als adjuvante Therapie eingesetzt. Da jedoch nur 25-30% aller Mammakarzinome eine Überexpression von HER-2 aufweisen, ist die erfolgreiche Anwendung von Trastuzumab auf diese Patientinnen beschränkt.¹¹

Weitere Antikörper sind bereits als Medikament zugelassen, wie z.B. Rituximab (MabThera®), ein anti-CD20-Antikörper, der an B-Zell-Lymphomzellen bindet, was zur Zerstörung dieser Zellen durch das Immunsystem führt.^{13, 14} Neben dem direkten Angreifen der Tumorzellen ist auch die Hemmung der Angiogenese ein Ziel neuer Tumorthérapien. Verschiedene Angiogenesehemmer wie z.B. Sorafenib (Nevaxar®) sind bereits zugelassen.¹⁵ Ein weiteres Beispiel ist der Antikörper Bevacizumab (Avastin®),¹⁶ der an den VEGF-Rezeptor („Vascular Endothelial Growth Factor Receptor“) bindet und so eine Ausbildung neuer Blutgefäße verhindert, die zur Versorgung eines wachsenden Tumors erforderlich sind. Die in neuerlichen Tumorthérapien angewendeten monoklonalen Antikörper sind sehr spezifisch. Daraus ergibt sich der Vorteil eines, verglichen mit einer Chemotherapie, geringen Nebenwirkungsspektrums, zumal die auftretenden Nebenwirkungen meist nach Absetzen des Medikaments schnell wieder nachlassen.¹⁷

Bei der Entstehung von Tumoren verändern sich die betroffenen Zellen. Unter anderem exprimieren sie sogenannte Tumorantigene. Das sind Proteine, die vorwiegend von Tumorzellen produziert und auch präsentiert werden.¹⁸ Diese Veränderungen zellulärer Proteine bleibt vom Immunsystem meist unerkannt, da Tumorzellen zum einen oftmals schwache Antigenpräsentatoren sind,¹⁹⁻²¹ zum anderen es sich bei den Tumorantigenen häufig um körpereigene Proteine handelt. Dies führt dazu, dass die Tumorzellen vom körpereigenen Immunsystem nicht als entartet erkannt werden, wie es sonst bei körperfremden Antigenen und Zellen der Fall ist. Darüber hinaus schützt sich der Tumor vor infiltrierenden Effektorzellen²²⁻²⁶ oder rekrutiert bzw. induziert regulatorische T-Zellen.^{27, 28} Diese wiederum können Effektor-T-Zellen,²⁹⁻³⁴ NK-Zellen³⁵ oder dendritische Zellen³⁶ inhibieren.

In verschiedenen experimentellen Ansätzen wird zurzeit versucht das Immunsystem auf die veränderten Zellen aufmerksam zu machen, um ein Zerstören des Tumors durch das Immunsystem zu ermöglichen. Eine Möglichkeit ist die zelluläre Immuntherapie. Dabei werden dendritische Zellen (DC) ex vivo mit entsprechenden

Antigenen beladen und den Patienten wieder zugeführt.³⁷⁻⁴⁰ Diese Behandlungsmethoden befinden sich noch in der Phase der klinischen Studien und verschiedene Probleme dieser Methode sind bisher noch ungelöst.⁴¹⁻⁴³ Die technische Komplexität der DC-Generierung ist sehr hoch und viele dieser Zellen gehen während der Aufarbeitung verloren. Zusätzlich wird die Zahl der immunstimulierenden dendritischen Zellen in den entsprechenden Lymphknoten durch unterschiedliches Migrationsverhalten der injizierten dendritischen Zellen *in vivo* weiter reduziert.^{42, 44}

Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Methode umgeht die *ex vivo*-Beladung der dendritischen Zellen. Wir verwenden ein System, bei dem die dendritischen Zellen mit Hilfe eines Antikörpers, der gegen einen spezifischen Antigen-Rezeptor gerichtet ist, direkt *in vivo* beladen werden. Dies reduziert den Behandlungsaufwand auf ein Minimum und ist darüber hinaus, wie im folgenden Kapitel beschrieben, sehr effektiv. Da sich diese Untersuchungen noch im vorklinischen Stadium befinden, werden die Wirkungsweise und verschiedene Behandlungsmöglichkeiten in Tiermodellen untersucht.

Eine Option, die Auswirkungen einer Behandlung auf das Tumorwachstum in Tiermodellen zu untersuchen, sind transplantierbare Tumoren in der Maus. Dabei handelt es sich um Zellen muriner Tumorzelllinien, die nach z.B. subkutaner Injektion einen Tumor etablieren. Des Weiteren können auch injizierte chemische Substanzen einen Tumor induzieren^{45, 46} oder es werden Karzinogene mehrmals auf die Haut der Mäuse aufgetragen,^{46, 47} um so die Veränderungen in den Hautzellen hervorzurufen. Auch mit Hilfe von UV-Strahlung können speziell Melanome induziert werden, wobei hier u.a., wie auch bei der chemischen Induktion, transgene Mäuse verwendet werden, die aufgrund ihrer genetischen Veränderung besonders sensitiv gegenüber UV-Strahlung⁴⁸ oder Karzinogenen sind.⁴⁹ In anderen, transgenen Mausmodellen werden Onkogene von den Mäusen exprimiert, die zur Entstehung eines Tumors führen. Hierbei werden auch Mechanismen eingebaut, um die Expression des Onkogens zu kontrollieren. So gibt es z.B. Modelle, in denen die Expression durch Cre/Lox-Rekombination induziert wird⁵⁰ oder konstitutiv unter der Kontrolle eines organspezifischen Promotors lokal begrenzt stattfindet.⁵¹⁻⁵³

In den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten wurden hauptsächlich die für das Large T Antigen (Tag-Protein) transgenen Tumorzelllinien RMA-Tag und B16-

Tag verwendet. Das Tag-Protein diene hierbei als Modell-Tumorantigen. Die Tag-transgenen Tumorzellen exprimieren und präsentieren das Tag-Protein, gegen das in verschiedenen Vakzinierungsstudien immunisiert wurde. Die durch die Immunisierung aktivierten Effektorzellen sollten dann in der Lage sein die Tumorzellen zu erkennen und abzutöten.

Die Tag-transgene RMA-Tag-Zelllinie basiert auf der Tumorzelllinie RMA. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine Lymphomzelllinie, die von der Zelllinie RBL-5, einem Rauscher-Virus-induzierten T-Zelllymphom, abstammt.^{54, 55} Zudem fand die Tag-transgene B16-Melanom-Zelllinie B16-Tag Anwendung. In den hier beschriebenen Experimenten wurden die Tumorzellen beider Zelllinien jeweils subkutan appliziert. Fünf bis sechs Tage nach Injektion waren die Tumoren sichtbar und erreichten nach drei bis vier Wochen eine kritische Größe von rund einem Kubikzentimeter, sofern die Mäuse unbehandelt blieben.

Neben der subkutanen Applikation gibt es noch weitere Anwendungsmöglichkeiten dieser Tumorzelllinien. So können z.B. B16-Melanomzellen auch intravenös gegeben werden, um einen metastasierenden Tumor zu imitieren und um entsprechende Behandlungsmethoden gegen Metastasen zu testen.⁵⁶ Der Vorteil von subkutan applizierten Tumoren liegt darin, dass das Tumorstadium permanent verfolgt, analysiert und eventuelle Behandlungserfolge in den verschiedenen Phasen des Tumorstadiums genau erfasst werden können. Ein weiterer Vorteil der transplantierbaren Tumoren ist das relativ schnelle Wachstum. So können innerhalb relativ kurzer Zeit in aufeinanderfolgenden Versuchen verschiedene Parameter variiert werden.

Allerdings ist zu berücksichtigen, ob sich diese schnell wachsenden, transplantierten Tumoren eine „natürliche Umgebung“ schaffen, z.B. durch die Vaskularisierung, die Struktur des Tumorendothels oder die Ausschüttung verschiedener Zytokine. So sind transplantierbare Tumoren zwar ein sehr gutes Werkzeug, um grundlegende Mechanismen zu erforschen, bleiben dabei aber bis zu einem gewissen Grad artifiziell.⁵⁷

Aus diesen Gründen wurde hier zusätzlich mit einem autochthonen Tumormodell gearbeitet. Hierbei entsteht der Tumor ohne weitere Behandlung selbständig und stufenweise, was der natürlichen Entstehung eines Tumors eher entspricht. Dabei bildet sich eine dementsprechend natürliche Umgebung des Tumors aus. Dies ist der

Vorteil dieser Tumormodelle, da sie sich somit wesentlich näher an der klinischen Situation befinden als die transplantierbaren Tumoren. Jedoch sind sie in der Regel auch schwerer zu therapieren.⁵⁷

Bei dem hier verwendeten autochthonen Tumormodell handelt es sich um das RIP1-Tag5-Tumormodell (s. Abb.1). In diesem transgenen Tiermodell wird das SV40 Large T Antigen (Tag-Protein) unter der Kontrolle des Ratten-Insulin-Promotors (RIP) organspezifisch in den beta-Zellen des Pankreas exprimiert. Die Expression des Tag-Proteins beginnt, wenn die Mäuse ein Alter von zehn Wochen erreicht haben.⁵⁸ Das Onkogen Tag-Protein greift in den Zellzyklus der Zellen ein, wodurch dieser außer Kontrolle gesetzt wird.⁵⁹⁻⁶¹ Die unkontrollierte Vermehrung der beta-Zellen führt daraufhin in einem Alter der Mäuse von 16 Wochen zu einer Veränderung der vaskulären Strukturen in den Langerhans-Inseln, dem sogenannten „Angiogenic Switch“. Nach 23 Wochen besitzen die Mäuse einen soliden, etablierten Pankreastumor. Dabei entwickeln die Mäuse aufgrund der Insulinüberproduktion eine massive Hypoglykämie, an der sie im Alter von rund 32 Wochen sterben, sofern sie unbehandelt bleiben.⁶²

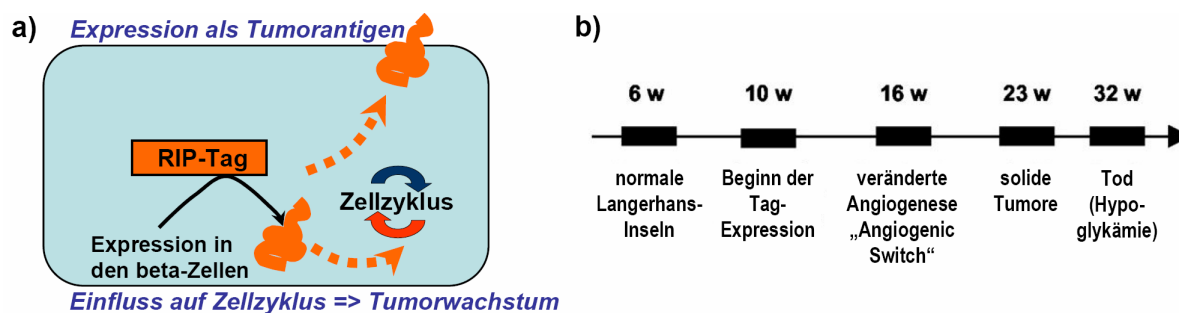


Abbildung 1: Das autochthone RIP1-Tag5-Tumormodell.

a) Die Funktion des Tag-Proteins als Tumorantigen und die Einflussnahme bei der Tumorentstehung. Das Tag-Protein wird unter der Kontrolle des Ratten-Insulinpromotors (RIP) organspezifisch in den beta-Zellen des Pankreas exprimiert. **b)** Die Tumorentstehung und der Krankheitsverlauf der RIP1-Tag5-Mäuse.⁶²

Ein Experiment mit Mäusen eines autochthonen Tumormodells kann, wie am beschriebenen Krankheitsverlauf erkennbar, mehrere Monate in Anspruch nehmen. Dabei ist es oft schwierig eine Aussage über den Verlauf der Krankheit zu treffen, da das Tumorwachstum in den inneren Organen der Maus von außen nicht beobachtet werden kann. Im beschriebenen RIP1-Tag5-Tumormodell ist es möglich über die Messung des Blutzuckerspiegels der Mäuse eine Aussage über den Verlauf der Krankheit zu treffen.⁶² Darüber hinaus werden derzeit verschiedene Tumormodelle

entwickelt, in denen die Tumorzellen zusätzlich Luziferase exprimieren. Dies ermöglicht das „*in vivo*-imaging“ der Tumoren bezüglich ihrer Lage und Größe, auch wenn innere Organe befallen sind.^{63, 64} Die durch die Luziferase erzeugte Lumineszenz kann durch hochsensitive Kamerasysteme in der lebenden Maus detektiert werden, ohne die Mäuse zu sezieren. So kann zukünftig, wie schon bei subkutanen Tumormodellen, der Verlauf des Tumorwachstums verfolgt werden.

1.2 Dendritische Zellen und der Antigen-Rezeptor DEC205

Das Immunsystem wird in zwei funktionelle Bereiche aufgeteilt, in die angeborene Immunität und die erworbene oder adaptive Immunität. Zur angeborenen Immunität gehören Zellen und Funktionen wie z.B. die Makrophagen, Granulozyten und das Komplementsystem, die für eine schnelle, aber unspezifische Immunantwort zuständig sind und somit das erste Schutzschild gegen Fremdkörper bilden. Die B- und T-Zellen sind Zellen der adaptiven Immunität und zeichnen sich durch ihre Antigen-spezifität aus. Darüber hinaus sind sie für die Unterscheidung zwischen „Fremd“ und „Eigen“ und für die Ausbildung des „immunologischen Gedächtnisses“ zuständig und sorgen so für einen nachhaltigen Schutz.

Die T-Zellen der adaptiven Immunität benötigen wiederum die antigenspezifische Aktivierung durch Antigen-präsentierende Zellen. Unter den bekannten Antigen-präsentierenden Zellen sind die dendritischen Zellen die effektivsten T-Zell-aktivierenden Zellen des Immunsystems. Sie entstehen als Vorläufer im Knochenmark. Nach der Ausdifferenzierung zu dendritischen Zellen wandern sie in alle Gewebe des Körpers ein und nehmen dort Antigene auf. Nach der Aufnahme von Antigenen in der Peripherie wandern die dendritischen Zellen über die afferenten lymphatischen Gefäße in die Lymphknoten.⁶⁵ Während dieser Prozesse reifen die dendritischen Zellen weiter aus und werden dabei zu sehr potenten T-Zell-Stimulatoren. Entsprechend ihrer starken Expression von MHC-Molekülen („Major Histocompatibility Complex“) und co-stimulatorischen Molekülen der B7-Familie sind sie äußerst effizient in der Antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung.⁶⁶

In den Lymphknoten interagieren die dendritischen Zellen antigenspezifisch über den MHC-Peptid-Komplex mit den T-Zell-Rezeptoren der T-Zellen. Für die Aktivierung der T-Zelle ist jedoch ein zweites Signal notwendig. Dieses Signal wird durch die Bindung eines Moleküls der B7-Familie, B7.1 (CD80) oder B7.2 (CD86) der reifen dendritischen Zelle an den CD28-Rezeptor der naiven T-Zelle auf diese übertragen. Aktivierte T-Zellen tragen zusätzlich den Rezeptor CTLA-4, der ebenfalls die genannten B7-Moleküle binden kann. Bleibt die Aktivierung der T-Zellen durch dieses zweite Signal aus, werden sie anergisch, d.h. sie werden nicht aktiviert und sind im Weiteren auch nicht mehr aktivierbar.^{67, 68}

Es gibt verschiedene Arten, wie Antigen-präsentierende Zellen Antigene aufnehmen. Neben der unspezifischen Aufnahme wie der Phagozytose oder der Pinozytose gibt es auch die spezifische, Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Antigenen. Durch die Phagozytose, die primär von den Makrophagen durchgeführt wird, werden größere Partikel oder sogar ganze Zellen aufgenommen und in intrazellulären Kompartimenten, den Lysosomen mit Hilfe von Enzymen verdaut. Einzelne Fragmente werden anschließend über die MHC-Komplexe präsentiert. Ähnlich ist es bei der Pinozytose. Hier werden lösliches Material und Moleküle aus der Umgebung der Antigen-präsentierenden Zellen unspezifisch in Makropinosomen aufgenommen, verdaut und anschließend zur Antigenpräsentation weitergeleitet.^{69, 70}

Bei der Rezeptor-vermittelten Aufnahme werden nur spezifisch vom Rezeptor gebundene Antigene aufgenommen, verdaut und präsentiert. Nach dem Binden eines Antigens bilden sich sogenannte „coated pits“ an der Membran, die mit Hilfe von Clathrin ein Vesikel bilden, in dem der Rezeptor-Antigen-Komplex in die Zelle internalisiert wird.⁷¹ Nach der Fusion mit anderen Vesikeln entsteht das frühe Endosom. Der niedrigere pH-Wert des Endosoms führt zur Trennung von Rezeptor und Antigen. Der Rezeptor wird dann vermutlich in kleinen Vesikeln, die sich vom Endosom abspalten an die Zellmembran zurücktransportiert.^{72, 73}

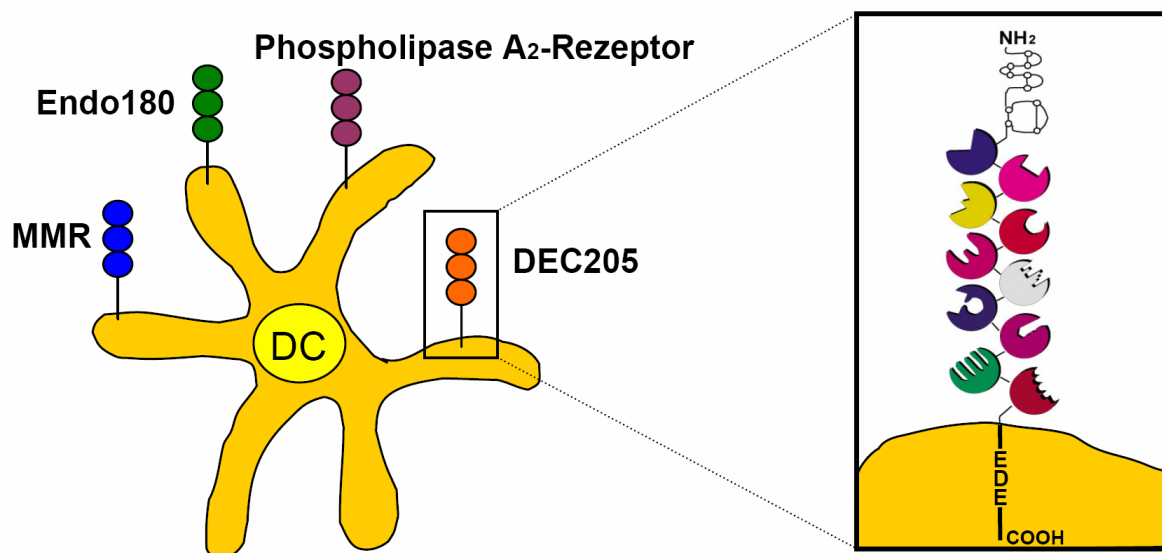


Abbildung 2: Antigenrezeptoren der dendritischen Zelle (DC).

Die Mitglieder der Makrophagen-Mannose-Rezeptor-Familie, Endo180, der Phospholipase A₂-Rezeptor, der Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MMR) und DEC205. Rechts: Detailansicht des DEC205-Rezeptors.

Zu den Antigen-Rezeptoren der dendritischen Zellen gehören unter anderem die Rezeptoren der Makrophagen-Mannose-Rezeptor-Familie (Abb. 2). Zu ihr gehören der Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MMR, CD206),^{69, 74, 75} Endo180 (CD280),⁷⁶ der Phospholipase A₂-Rezeptor^{77, 78} und der DEC205-Rezeptor (dendritischer Endozytose-Rezeptor, 205 kDa, CD205).^{72, 79}

Bei den Mitgliedern der Makrophagen-Mannose-Rezeptor-Familie handelt es sich um Typ-I-Transmembranproteine.⁸⁰⁻⁸² Diese verfügen über eine Transmembran-Domäne, wobei der N-Terminus extrazellulär und der C-Terminus intrazellulär ist. Während der Makrophagen-Mannose-Rezeptor über acht CRDs („Carbohydrate Recognition Domains“) verfügt,^{78, 80, 81} besteht der DEC205-Rezeptor aus insgesamt zehn solcher extrazellulärer Domänen (Abb. 2), die unterschiedliche Substanzen vermutlich u.a. über unterschiedliche Glykosilierungsmuster binden können.^{72, 82} Zwischen der N-terminalen Cystein-reichen Domäne und den CRDs befindet sich noch eine Fibronectin Typ-II Domäne. Der DEC205-Rezeptor ist ein konstitutiv rezirkulierender Rezeptor, der ständig Antigene in die Zelle transportiert und anschließend wieder auf die Zelloberfläche zurückbefördert wird.⁷³

Während die Antigene, die beispielsweise über den Makrophagen-Mannose-Rezeptor aufgenommen werden, in frühe endosomale Kompartimente („early endosomal compartments“) transportiert werden,^{83, 84} werden die über DEC205 aufgenommenen Antigene in späte, endosomale Kompartimente („late endosomal compartments“) geleitet.⁷³ Diese Kompartimente fusionieren mit MHC-Kompartimenten, in denen die Beladung der MHC-Klasse II-Moleküle stattfindet.⁷² Verantwortlich für den Transport zu den MHC-Kompartimenten ist ein Teil der intrazellulären Sequenz des DEC205-Rezeptors, die Signalsequenz „EDE“ (Glutamin-Aspartat-Glutamin).⁷³ Dieser direkte Transport zu den MHC-Kompartimenten führt dann zu einer sehr effektiven Antigenpräsentation und der Antigen-spezifischen Aktivierung der CD4-positiven T-Zellen.⁷³

Darüber hinaus sind DEC205-positive dendritische Zellen besonders effektiv in der Antigen-spezifischen Aktivierung der CD8-positiven T-Zellen.⁸⁵ Diese werden über einen MHC-Klasse I-Peptid-Komplex der dendritischen Zellen aktiviert, die normalerweise nur mit endogenen Peptiden beladen sind. Klassischerweise werden exogene Antigene, wie die über DEC205 aufgenommenen, auf MHC-Klasse II präsentiert.⁸⁶ Doch durch einen Mechanismus, den man „crosspriming“ nennt,

können exogene Antigene auch auf MHC-Klasse I präsentiert werden.⁸⁷ Die DEC205-positiven dendritischen Zellen verfügen über einen besonders effektiven TAP-abhängigen „crosspriming“-Mechanismus.⁸⁵

Wie schon erwähnt lösen aufgenommene Antigene allein noch keine Immunantwort aus. Die Antigene werden zwar auf MHC-Molekülen präsentiert und es kommt auch zu T-Zell-Kontakten, aber die T-Zellen werden nicht aktiviert oder zur Proliferation angeregt.^{85, 86, 88-90} Eine zusätzliche Aktivierung und Reifung der dendritischen Zellen mit Hilfe sogenannter „Danger“-Signale ist notwendig, um eine effektive Immunantwort auszulösen, da nur reife dendritische Zellen in der Lage sind Helfer-T-Zellen (CD4) und zytotoxische T-Zellen (CD8) zu aktivieren und zur Proliferation anzuregen (Abb. 3).⁹¹

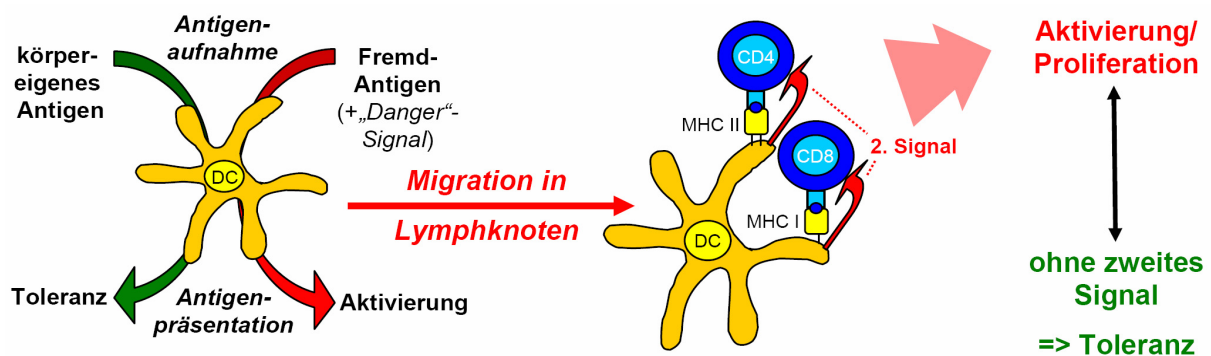


Abbildung 3: Die Rolle der dendritischen Zelle (DC) in der Antigenpräsentation.

Die dendritische Zelle nimmt Antigene auf (links) und präsentiert diese den T-Zellen (rechts). Empfängt die DC ein „Danger“-Signal führt dies nach Migration in den Lymphknoten zur Aktivierung und zur Proliferation der T-Zellen. Hierfür ist zusätzlich zur TCR-MHC-Bindung ein zweites Signal notwendig (rechts), bleibt dieses aus, wird Toleranz induziert.

Eine Möglichkeit dendritische Zellen *in vivo* zu aktivieren ist es, zusätzlich zum Antigen CD40-Liganden zu injizieren. Diese binden dann an die CD40-Moleküle der dendritischen Zellen und aktivieren so diese Zellen.^{85, 92} Häufig werden auch parallel zur Antigengabe Substanzen verabreicht, die eine bakterielle oder virale Infektion vortäuschen und so das Immunsystem bzw. die dendritischen Zellen aktivieren. Diese Substanzen werden von sogenannten „Toll-like“-Rezeptoren (TLR) der Antigen-präsentierenden Zellen gebunden. Mehr als zehn unterschiedliche TLRs, die jeweils bestimmte Substanzen binden, sind inzwischen bekannt.^{81, 93} Die TLRs lösen nach dem Binden der jeweiligen Substanz, für die sie spezifisch sind, eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt.^{94, 95} Dabei sind mehrere Signalwege bekannt, die zur Aktivierung des

Transkriptionsfaktors NF- κ B führen. Dies wird über TRIF,^{96, 97} TIRAP⁹⁸⁻¹⁰⁰ oder auch über MyD88^{94, 101, 102} übermittelt. NF- κ B ist für die Transkription verschiedenster proinflammatorischer Zytokine verantwortlich.^{100, 101} Diese Zytokinproduktion führt zum einen zur Aktivierung und Reifung der dendritischen Zelle und befähigt darüber hinaus die dendritische Zelle, u.a. durch Ausschüttung von Zytokinen, andere Immunzellen zu aktivieren.^{103, 104}

Unterschiedliche TLR-Liganden werden für Immunisierungsversuche eingesetzt. So z.B. Lipopolysaccharid (LPS), das an den TLR4 bindet.¹⁰⁴ LPS ist eine Komponente der Zellhülle Gram-negativer Bakterien und stellt somit eine bakterielle Infektion dar. Ähnlich wie CpG-ODN,¹⁰⁵ das vom TLR9 gebunden wird.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ CpG-ODNs sind kurze, unmethylierte, doppelsträngige DNA-Stücke mit bakterieller Sequenz, die durch Phosphorothioat stabilisiert sind. Bei poly I:C wiederum, das an den TLR3 bindet, handelt es sich um synthetische, doppelsträngige RNA, die eine Sequenz viralen Ursprungs besitzt.¹⁰⁹ Darüber hinaus kommen auch die etwas kleineren Moleküle R-848 und Imiquimod als TLR7-Liganden zum Einsatz.¹¹⁰ Die einzelnen TLRs lösen nach dem Binden ihrer Liganden teilweise verschiedene Signalwege aus, wobei dies gegebenenfalls mit unterschiedlicher Gewichtung geschieht.¹¹¹ Die über den TLR3 ausgelöste Signalkaskade führt z.B. über TRIF und ist dabei MyD88-unabhängig.^{95, 96, 109} Dementsprechend kann durch die Kombinationsgabe unterschiedlicher TLR-Liganden eine verbesserte Aktivierung der Antigen-präsentierenden Zellen erzielt werden, da hier mehrere Signalwege parallel ausgelöst werden.¹⁰³

Der DEC205-Rezeptor auf vielen dendritischen Zellen (DCs) stark exprimiert, wie z.B. DCs epidermalen Ursprungs und proliferierenden BMDCs,⁷⁹ aber auch in der T-Zell-Zone der Lymphknoten.¹¹²⁻¹¹⁴ Zudem sind die CD8-positiven dendritischen Zellen in der Milz DEC205-positiv, die dort ebenfalls in der T-Zell-Zone zu finden sind.⁹² Diese DEC205-Expression der dendritischen Zellen ist sehr vorteilhaft, da man mit entsprechendem Antikörper verschiedenste Antigene zu den dendritischen Zellen *in vivo* transportieren kann, ohne dass andere Zellen beeinflusst werden. Der anti-DEC205-Antikörper (HB290/NLDC145)^{115, 116} bindet nach subkutaner Injektion dendritische Zellen, die in den T-Zell-Zonen der sekundären lymphoiden Organe lokalisiert sind, dem Ort des T-Zell-Kontaktes.^{85, 86} Für einen gezielten Transport von Antigenen zu dendritischen Zellen werden die zu präsentierenden Antigene chemisch^{56, 91} an den Antikörper gekoppelt oder es werden Fusionsantikörper

hergestellt,^{117, 118} die zum einen an DEC205 binden können und zusätzlich das entsprechende Antigen beinhalten. Bleiben die dendritischen Zellen dabei unreif, im sogenannten „steady state“, wird Toleranz erzeugt^{65, 85, 86} und es werden sogar Antigen-spezifische, regulatorische T-Zellen induziert.¹¹⁹⁻¹²¹

Werden die dendritischen Zellen bei der Injektion der anti-DEC205-Konstrukte zusätzlich aktiviert, z.B. mit TLR-Liganden, wird eine sehr potente Immunantwort ausgelöst. Dabei werden sowohl die T-Helfer-Zellen (CD4-positiv)^{91, 117, 118} als auch die zytotoxischen T-Zellen (CD8-positiv)^{91, 122, 123} Antigen-spezifisch aktiviert. Beide Zelltypen sind für eine nachhaltige Tumormunität sehr wichtig. Zytotoxische T-Zellen können die Tumorzellen direkt zerstören, während die T-Helfer-Zellen die Ausdifferenzierung von Gedächtniszellen und die Aktivierung von Makrophagen und B-Zellen unterstützen. In vergangenen Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass an anti-DEC205 gekoppelte Tumorantigene, wie z.B. TRP-2, nach Injektion zu einem effizienten Schutz vor Tumoren führte. Des Weiteren konnten bereits existierende, transplantierte B16-Tumoren in ihrem Wachstum gehemmt und bis zu 70% der Mäuse geheilt werden, nachdem anti-DEC205-gekoppelte Tumorantigene (TRP-2 und gp100) subkutan verabreicht wurden.⁵⁶

Wir wollen diese Ergebnisse daher auf ein autochthones Tumormodell übertragen und untersuchen, inwieweit eine DC-gerichtete Immunisierung mit anti-DEC205-Tag-Konjugaten in der Lage ist, das Tumorstadium im RIP1-Tag5-Modell zu unterbinden.

1.3 Ziel der Arbeit

In den letzten Jahren wurden verschiedene Immuntherapien entwickelt, um einer Tumorentstehung vorzubeugen. Dazu gehören Immunisierungsmethoden, in denen für Tumorantigene codierendes Erbgut mit Hilfe einer „gene gun“^{124, 125} oder durch Viren in Immunzellen eingebracht wurde.^{47, 126-128} Aber auch zelluläre Therapien wurden getestet, wie z.B. der Transfer Peptid-gepulster aktivierter dendritischer Zellen oder der Transfer aktivierter, Antigen-spezifischer T-Zellen.^{37-40, 129} Auch die passive Immunisierung durch die Gabe von Proteinen und Peptiden fand mehrfach Anwendung.^{62, 130, 131}

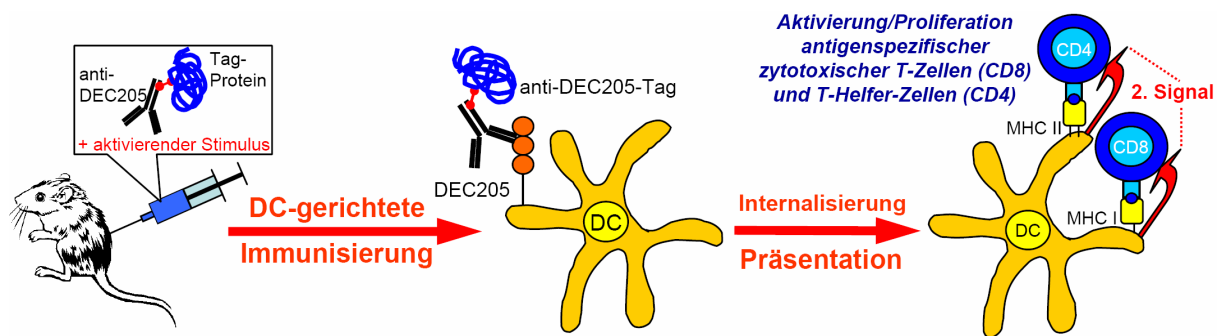


Abbildung 4: DC-gerichtete Immunisierung mit anti-DEC205-Konjugaten.

Das anti-DEC205-Proteinkonjugat wird gemeinsam mit einem aktivierenden Stimulus subkutan verabreicht (links). Durch den anti-DEC205-Antikörper wird das Antigen (Tag-Protein) *in vivo* zum DEC205-Rezeptor der dendritischen Zellen (DC) transportiert (Mitte). Über den DEC205-Rezeptor wird das Antigen aufgenommen und nach intrazellulärer Prozessierung auf MHC-Molekülen präsentiert (rechts). Die Gabe des aktivierenden Stimulus führt zur Reifung der DCs, die wiederum in der Lage sind, die über den T-Zellrezeptor antigenspezifisch gebundenen T-Zellen zu aktivieren (2. Signal).

Häufig waren diese Therapien erfolgreich, wenn sie präventiv eingesetzt wurden. In einem therapeutischen Versuchsaufbau ließ ihre Effektivität aber zu wünschen übrig. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten soll untersucht werden, inwieweit DC-gerichtete Immunisierung mit Hilfe des anti-DEC205-Antikörpers (s. Abb.4) eine therapeutische Wirkung hat. Des Weiteren soll untersucht werden, ob mit dieser gezielten Immunisierung durch Kombinationsbehandlungen wie z.B. der Depletion regulatorischer T-Zellen Synergieeffekte erzielt werden können. Außerdem sollen die Erfahrungen, die mit Transplantations-Tumormodellen gesammelt werden konnten, auf ein autochthones Tumormodell übertragen werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Biochemische Methoden

2.1.1 Chemikalien

Die im Folgenden genannten Chemikalien wurden, wenn nicht anders genannt, von Sigma/Fluka (Taufkirchen) oder Carl Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.1.2 Antikörperaufreinigung

Die verwendeten monoklonalen Antikörper anti-DEC205 (HB290) und anti-CD25 (PC61) wurden, wie im Folgenden beschrieben, aus Zellüberständen aufgereinigt.

2.1.2.1 Aufreinigung des monoklonalen anti-DEC205-Antikörpers

Die Zellüberstände der fünf- bis sechstägigen Zellkulturen der Hybridomzelllinie HB290 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) wurden gesammelt und bis zur Aufreinigung bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Überstände durch einen 0,20 µm Filter (Sartorius, Göttingen) gegeben, um ungelöste Stoffe abzutrennen und ca. fünf Minuten mittels einer Wasserstrahlpumpe entgast. Vor und nach dem Auftragen der ca. 100 ml des Überstandes auf die Protein G Säule (UltraLink® AffinityPak™ Protein G Column, Pierce/Thermo-Scientific, Bonn) wurde diese mit 40-50 ml PBS gespült. Eluiert wurde mit einem Elutionspuffer (ImmunoPure® IgG Elution Buffer, Pierce/Thermo-Scientific, Bonn) mit zehn Fraktionen zu je 1 ml. Die Fraktionen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt, in denen 100 µl 1,5 M Tris, pH 7,5 vorgelegt wurden. Die Konzentrationsbestimmung der gesammelten Fraktionen erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm. Fraktionen mit einem Wert über 0,1 OD wurden zusammengegeben und über Nacht bei 4°C gegen PBS dialysiert (Snakeskin™ Pleated Dialysis Tubing, Pierce/Thermo-Scientific, Bonn). Für die weitere Verwendung wurde die Konzentration nach der Dialyse erneut bestimmt (1,35 OD₂₈₀ = 1 mg/ml). Nach der Elution wurde die Protein G Säule mit weiteren 10 ml Elutionspuffer, 40-50 ml PBS und zur Lagerung der Säule mit 40-50 ml 0,02% Natrium-Azid-Lösung gewaschen. Der aufgereinigte Antikörper wurde vor der

weiteren Verwendung in verschiedenen Bindungsversuchen auf seine Funktionalität hin untersucht.

2.1.2.2 Aufreinigung des monoklonalen anti-CD25-Antikörpers

Die Zellüberstände der sechstägigen Zellkulturen der Hybridomzelllinie PC61 (von E. Suri-Peyer zur Verfügung gestellt) wurden gesammelt und bis zur Aufreinigung bei minus 20°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Überstände durch einen 0,20 µm Filter (Sartorius, Göttingen) gegeben, um ungelöste Stoffe abzutrennen, und ca. fünf Minuten mittels einer Wasserstrahlpumpe entgast. Für die Aufreinigung des Antikörpers wurde die HiTrap™ Protein G HP Säule (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) verwendet, die mit Hilfe einer Schlauchpumpe beladen wurde. Vor und nach dem Auftragen der ca. 70 ml des Überstandes auf die Säule wurde diese mit 40-50 ml 20 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,0 gespült. Eluiert wurde mit 0,1 M Glycin, pH 2,7 in zehn Fraktionen zu je 1 ml. Die Fraktionen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt, in denen 100 µl 1 M Tris/HCl pH 9 vorgelegt wurden. Die Konzentrationsbestimmung der gesammelten Fraktionen erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm. Fraktionen mit einem Wert über 0,1 OD wurden zusammengegeben und über Nacht bei 4°C gegen PBS dialysiert (Snakeskin™ Pleated Dialysis Tubing, Pierce/Thermo-Scientific, Bonn). Für die weitere Verwendung wurde die Konzentration nach der Dialyse erneut bestimmt (1,35 OD₂₈₀ = 1 mg/ml). Nach der Elution wurde die Protein G Säule mit weiteren 10 ml 0,1 M Glycin, pH 2,7, 40-50 ml 20 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,0 und zur Lagerung der Säule mit 40-50 ml einer 20%-igen Ethanol-Lösung gewaschen. Der aufgereinigte Antikörper wurde vor der Verwendung auf seine Funktionalität hin getestet. Dafür wurden 300 µg des Antikörpers einer Maus i.p. injiziert und die Abnahme der Anzahl der CD25-positiven Zellen in den Lymphknoten und in der Milz nach 48 Stunden gegenüber einer Kontrollmaus verglichen.

2.1.3 Herstellung der Antikörper-Konjugate

Für die Beladung der dendritischen Zellen mit Tumorantigenen *in vivo* wurden die Tumorantigene chemisch an den monoklonalen anti-DEC205-Antikörper gekoppelt. Da die zuvor beschriebene Kopplungs-Methode⁵⁶ aufgrund des Vorhandenseins von reduzierten Sulfhydryl-Gruppen in den zu koppelnden Proteinen, beta-Galactosidase (beta-Galactosidase aus E. coli) und des Large T Antigens (Tag; von N. Garbi zur

Verfügung gestellt), nicht angewendet werden konnte, musste eine neue Methode etabliert werden. Dabei kamen hetero-bifunktionelle Crosslinker zum Einsatz. Der bereits zuvor verwendete Crosslinker „Sulfosuccinimidyl 4-(*N*-Maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate“ (Sulfo-SMCC, Pierce/Thermo-Scientific, Bonn) und der Crosslinker „4-(4-*N*-Maleimidophenyl)Butyric Acid Hydrazide Hydrochloride“ (MPBH, Pierce/Thermo-Scientific, Bonn). Die getesteten Methoden sind im Folgenden beschrieben. Die hergestellten Konjugate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot auf die Kopplungseffizienz hin untersucht. Gegebenenfalls wurde auch die Bindung immunhistochemisch und mittels FACS-Analyse getestet und die Funktionalität per ELISPOT und in einem „*in vivo* kill“-Assay bestimmt.

2.1.3.1 Kopplung unter Verwendung des Crosslinkers MPBH

Der hetero-bifunktionelle Crosslinker „4-(4-*N*-Maleimidophenyl)Butyric Acid Hydrazide Hydrochloride“ (MPBH) verfügt über zwei unterschiedliche, reaktive Gruppen, die über einen 17,9 Å großen Spacer-Arm miteinander verbunden sind. Eine reaktive Gruppe ist das Maleimid, welches mit reduzierten Sulfhydryl-Gruppen der Cysteine eines Proteins reagieren kann. Die andere Gruppe ist das Hydrazid, welches mit zuvor oxidierten Glykosylierungsketten eines Proteins reagiert. Im folgenden Ansatz reagierte der Crosslinker zuerst mit dem zuvor oxidierten Antikörper. Danach wurde der Antikörper mit gebundenem Crosslinker, der sogenannte Maleimid-aktivierte Antikörper, für die Reaktion über das Maleimid mit den SH-Gruppen des zu koppelnden Proteins zusammengegeben. Die verschiedenen Parameter der Kopplung wurden wie angegeben variiert.

Um den Antikörper zu oxidieren, wurde Natrium-meta-Periodat in Konzentrationen zwischen 10 mM und 100 mM in „Labeling Solution“ (s.u.) gelöst und 50 µl davon zu 500 µl Antikörperlösung (2 mg/ml in Labeling Solution) gegeben. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur oder auf Eis für eine Stunde im Dunkeln. Zum Abstoppen der Oxidationsreaktion wurde Glycerol zugegeben (Endkonzentration 15 mM). Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis wurde der Ansatz dreimal mit Labeling Solution mit Hilfe von Konzentratorsäulen (Vivaspin 500, 50.000 MWCO, Sartorius, Göttingen) gewaschen. Anschließend wurde der Crosslinker MPBH in DMSO gelöst (10 mg/ml) und 50 µl davon auf Eis zum Protein zugegeben, gut gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgte die Abtrennung des nicht reagierten, überschüssigen Crosslinkers wie zuvor über

Konzentratorsäulen bei gleichzeitiger Umpufferung in Phosphat-NaCl-Puffer (s.u.). Parallel dazu wurde 1 mg des Proteins in 250 µl Phosphat-NaCl-Puffer gelöst, mit dem Hydrazid-aktivierten Antikörper zusammengegeben, gut gemischt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Labeling Solution: 0,1 M Natrium-Acetat, pH 5,5.

Phosphat-NaCl-Puffer: 0,1 M Natrium-Phosphat, 50 mM NaCl, pH 7,0.

2.1.3.2 Kopplung nach Blockieren der Sulfhydryl-Gruppen des Proteins

Der hetero-bifunktionelle Crosslinker „Sulfosuccinimidyl 4-(*N*-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate“ (Sulfo-SMCC) verfügt über zwei unterschiedliche reaktive Gruppen, die über einen 8,3 Å großen Spacer-Arm miteinander verbunden sind. Eine reaktive Gruppe ist der *N*-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS-Ester), der mit den primären Aminen eines Proteins reagieren kann. Die zweite reaktive Gruppe ist das Maleimid, welches mit reduzierten Sulfhydryl-Gruppen (SH-Gruppen) der Cysteine eines Proteins reagiert. Im folgenden Ansatz reagierte der Crosslinker zuerst über den NHS-Ester mit den Aminen des zu koppelnden Proteins. Zuvor mussten jedoch die freien SH-Gruppen des Proteins mit *N*-Ethylmaleimid (Fluka, Steinheim) blockiert werden, um ein Reagieren der einzelnen Proteine untereinander zu verhindern, was zum Ausfallen des Proteins führen würde. Danach wurde für die zweite Reaktion das Maleimid-aktivierte Protein mit dem Antikörper zusammengegeben, der zuvor mit Hilfe von beta-Mercaptoethylamin*HCl (2-MEA, Pierce/Thermo-Scientific, Bonn) partiell reduziert wurde.

Im Einzelnen wurden 3 mg *N*-Ethylmaleimid und 2 mg Protein in 200 µl PBS/EDTA gelöst und für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte die Abtrennung des nicht reagierten, überschüssigen *N*-Ethylmaleimids über Entsalzungs-Säulen (D-Salt™ Dextran Desalting Columns, Pierce/Thermo-Scientific, Bonn) nach den Vorgaben des Herstellers. Da es dabei zur Volumenvergrößerung kam, wurde die Lösung anschließend mit Hilfe der Konzentrationssäulen (Vivaspin 500, 50.000 MWCO, Sartorius, Göttingen) wieder auf das Ausgangsvolumen von 200 µl aufkonzentriert. In einem weiteren Schritt wurde 1 mg des Crosslinkers Sulfo-SMCC zum Maleimid-blockierten Protein zugegeben, gut gemischt und für 30-45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Abtrennung des nicht reagierten, überschüssigen Crosslinkers wie zuvor über Entsalzungs-Säulen und die Aufkonzentrierung auf das Anfangsvolumen von 200 µl. Parallel dazu wurden

2 mg des Antikörpers mit Konzentrator-Säulen (Vivaspin 6, 10.000 MWCO, Sartorius, Göttingen) in PBS/EDTA auf 200 µl (10 mg/ml) aufkonzentriert. Anschließend wurden 20 µl des in PBS/EDTA gelösten (6 mg/100 µl) Reduktionsmittels 2-MEA auf Eis zum Antikörper zugegeben, gut gemischt und für 90 Minuten bei 37°C inkubiert, gefolgt von einer Aufreinigung über Entsalzungssäulen, um das Reduktionsmittel abzutrennen. Bei der Reduktion des Antikörpers mit 2-MEA werden die Disulfid-Brücken zwischen den beiden schweren Ketten aufgebrochen und liegen anschließend im reduzierten Zustand als Sulfhydryl-Gruppen vor. Andere Disulfid-Brücken z.B. zwischen leichter und schwerer Kette des Antikörpers bleiben unbeeinflusst. Nach einer Aufkonzentrierung mit Hilfe der Konzentrator-Säulen auf das Anfangsvolumen von 200 µl wurde der reduzierte Antikörper und das Maleimid-aktivierte Protein auf Eis zusammengegeben, gut gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.1.3.3 Kopplung unter Verwendung des Crosslinkers Sulfo-SMCC

In diesem Ansatz wurde ebenfalls der zuvor beschriebene Crosslinker „Sulfosuccinimidyl 4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate“ (Sulfo-SMCC) verwendet. Hier jedoch wurden zuerst der Crosslinker und der Antikörper zusammengegeben, um eine Reaktion des *N*-Hydroxysuccinimid-Esters (NHS-Ester) mit den Aminen des Antikörpers zu ermöglichen. Der so Maleimid-aktivierte Antikörper konnte dann mit den Sulfhydryl-Gruppen des Proteins direkt reagieren und eine kovalente Verbindung eingehen.

Zu Beginn wurde 1 mg des Antikörpers mit Konzentrator-Säulen (Vivaspin 6, 10.000 MWCO, Sartorius, Göttingen) in PBS auf rund 300 µl aufkonzentriert. Parallel wurde ein Aliquot des Crosslinkers (No-Weigh™ Sulfo-SMCC 2 mg, Pierce/Thermo-Scientific, Bonn) mit 200 µl PBS bei 50°C gelöst und der NHS-Ester des Crosslinkers wie in Kapitel 2.1.4 beschrieben auf seine Reaktivität getestet. Anschließend wurden 14 µl des Crosslinkers auf Eis zum Antikörper zugegeben, gut gemischt und für ein bis zwei Stunden auf Eis inkubiert, gefolgt von einer Umpufferung mit Entsalzungssäulen (Zeba™ Desalt Spin Columns, Pierce/Thermo-Scientific, Bonn) in PBS, um den überschüssigen, nicht reagierten Crosslinker abzutrennen. Parallel dazu wurde 1 mg des Proteins entweder in 300 µl PBS gelöst (beta-Galactosidase) oder mit Konzentrator-Säulen (Vivaspin 500, 50.000 MWCO, Sartorius, Göttingen) auf 300 µl aufkonzentriert (Tag-Protein). Des Weiteren wurden auch verschiedene

Peptidvarianten des Tag-Epitops „TagIV“ (TagIV₍₄₀₄₋₄₁₁₎, TagIV₍₃₉₆₋₄₁₁₎ und TagIV_(396-411; C->L)) gekoppelt. Diese wurden dazu in DMSO und PBS gelöst (Konzentration 10 mg/ml) und mit PBS auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Vor dem Zusammengeben des Maleimid-aktivierten Antikörpers und des Proteins bzw. Peptids wurden die Reaktionspartner mit Hilfe des in Kapitel 2.1.5 beschriebenen Ellmantests überprüft. Die Zusammengabe erfolgte auf Eis unter ständigem Mischen. Bei der anschließenden ein- bis zweistündigen Inkubation auf Eis oder bei 4°C wurde bei frühem Einsetzen einer Trübung der Reaktion Cystein zugegeben, um die Reaktion zu terminieren und ein weiteres Ausfallen der Proteine zu verhindern.

2.1.4 Analyse der Reaktivität der NHS-Ester

Vor Zugabe des Crosslinkers zum Antikörper wurde der N-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS-Ester) des Crosslinkers auf seine Reaktivität überprüft. Nach Lösen des Crosslinkers in PBS wurden 14 µl in 1 ml PBS verdünnt. Nach der darauf folgenden photometrischen Bestimmung bei einer Wellenlänge von 280 nm wurden zu 500 µl der gemessenen Proben 100 µl 1 N NaOH-Lösung zugegeben, für 30 Sekunden gemischt und sofort photometrisch (280 nm) bestimmt. Eine Zunahme der Extinktion um 60-100% im Vergleich zum zuvor gemessenen Wert deutet auf eine ausreichende Reaktivität des NHS-Esters des Crosslinkers hin.

2.1.5 Ellman-Test

Zur Quantifizierung der Reaktivität der Kopplungspartner, der Sulfhydryl-Gruppen (SH-Gruppen) zum einen und der reaktiven Maleimid-Gruppen der aktivierten Antikörper zum anderen wurde der Ellman-Test etabliert. Die Zugabe von Ellman-Reagenz (5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure), Pierce/Thermo-Scientific, Bonn) zu einer Lösung mit reaktiven bzw. reduzierten SH-Gruppen löst einen Farbumschlag aus, der sich photometrisch bei einer Wellenlänge von 412 nm quantitativ bestimmen lässt.

2.1.5.1 Quantifizierung der reduzierten Sulfhydryl-Gruppen

Von den zu untersuchenden Proben wurden 5 µl mit 5 µl Ellmanpuffer gemischt. Als Nullwert wurden 10 µl Ellmanpuffer eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten 5 µl Cystein-Lösung (Cystein·HCl (0,35 mg/ml), Pierce/Thermo-Scientific, Bonn) plus 5 µl Ellmanpuffer. Anschließend wurden 102 µl der Ellman-Stocklösung (pro Probe 2 µl

Ellmanlösung (4 mg/ml) und 100 µl Ellmanpuffer) zu den Proben zugegeben. Nach einer Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Extinktion der Proben photometrisch bei 412 nm bestimmt.

Ellmanpuffer: 0,1 M Natrium-Phosphat, 1 mM EDTA, pH 8,0.

2.1.5.2 Quantifizierung der reaktiven Maleimidgruppen

Zur Untersuchung der Reaktivität der Maleimidgruppen wurden 5 µl der jeweiligen Probe mit 5 µl einer Cystein-Lösung gemischt. Dabei reagierte das Cystein über die SH-Gruppe mit dem reaktiven Maleimid. Im Anschluss wurde, wie oben beschrieben, die Ellman-Stocklösung zugegeben und die Proben nach der Inkubation photometrisch vermessen, um die Menge des nicht reagierten Cysteins zu quantifizieren. Eine verminderte Reaktivität der SH-Gruppen deutet somit auf eine Reaktivität der Maleimide hin.

2.1.6 SDS PAGE und Western Blot

Zur Überprüfung der Kopplungseffizienz wurde eine Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Nach dem Auftrennen der Proteine wurden die Gele direkt gefärbt oder auf eine Western-Blot-Membran geblottet, um die Proteine über spezifische Antikörper anfärben zu können.

Die Proteine wurden nach Zugabe des Ladepuffers über SDS-PAGE mit einem 11%-igen SDS-PAGE Trenngel aufgetrennt, wobei der „prestained SDS-PAGE Standard“ (Broad Range, Biorad, München) als Größenmarker diente. Als Sammelgel wurde ein 3%-iges SDS-PAGE Sammelgel verwendet. Das Gel (Geldicke 1mm) lief in einem 1x SDS-Laufpuffer bei einem konstanten Strom von 40 mA pro Gel und einer Spannung von 200 bis maximal 250 V (PerfectBlue Twin S, Peqlab, Erlangen).

Anschließend wurden die Proteine im Gel mit Hilfe des Silver Stain Kits (Silver Quest, Invitrogen, Karlsruhe) oder mit Coomassie-blau angefärbt. Alternativ wurden die Proteine in einem Blottingpuffer bei einem konstanten Strom von 150 mA und einer Spannung von 70-80 V in 1-1,5 h vom SDS-PAGE-Gel auf eine Membran (PVDF Western Blot Membrane, Roche Diagnostics, Mannheim) transferiert. Als primäre Antikörper kamen zum einen anti-beta-Galactosidase (rabbit IgG, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) und zum anderen anti-Tag (mouse IgG PAb416, Calbiochem/Merck KGaA, Darmstadt) in einer Verdünnung von 1:5000 zum Einsatz. Als sekundärer Antikörper diente der Peroxidase-konjugierte AffiniPure Goat Anti-

Rabbit und der Peroxidase-konjugierte AffiniPure Rat Anti-Mouse IgG-Antikörper (beide Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA). Diese wurden in einer 1:20000 Verdünnung eingesetzt. Zwischen den Inkubationen wurde dreimal mit TBS/T gewaschen. Durch einminütiges Inkubieren der Membran mit dem Amersham™ ECL Advance™ Western Blot Detection Kit (GE Healthcare, Freiburg) wurde die am sekundären Antikörper konjugierte Peroxidase durch eine enzymatische Reaktion zur Chemilumineszenz angeregt. Danach wurden entweder Filme (Hyperfilm™ECL™; GE Healthcare, Freiburg) bei Belichtungszeiten zwischen 15 und 45 Sekunden belichtet und anschließend entwickelt oder die Chemilumineszenz wurde direkt mit dem Imagingsystem (Biorad, München; Kamera Spot RT3/Software Spot Advanced, Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) aufgenommen.

SDS-PAGE Trenngel 11%: 4,5 ml H₂O, 3,15 ml 1,5 M TrisHCl (pH 8,8), 4,5 ml 30% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 125 µl 10% (w/v) SDS, 125 µl 10% (w/v) APS, 10 µl TEMED.

SDS-PAGE Sammelgel 3%: 3,4 ml H₂O, 625 µl 0,5 M TrisHCl (pH 6,8), 850 µl 30% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 50 µl 10% (w/v) SDS, 50 µl 10% (w/v) APS, 10 µl TEMED.

1x SDS-Laufpuffer: 14 g/l Glycin, 3 g/l Tris, 1 g/l SDS.

Blottingpuffer: 11,4 g/l Glycine, 2,42 g/l Tris, 200 ml/l Methanol.

TBS/T: 2,4 g/l Tris/HCl, 80 g/l NaCl, 1 ml/l Tween 20, pH 7,6.

2.1.7 Untersuchung der Bindung der Konjugate

Für die Untersuchung des Einflusses der chemischen Kopplung auf die Bindung der Antikörper wurden Bindungsversuche auf Milzzellen und auf Lymphknoten-Gefrierschnitten durchgeführt.

2.1.7.1 Bindung der Konjugate an Milzzellen

Nach der Isolierung der Milz aus einer unbehandelten Maus wurde diese durch einen 70 µm Zellsieb gedrückt und die Zellsuspension bei 1300 U/min und 4°C für sieben Minuten zentrifugiert. Nach der Lyse der Erythrozyten mit 2 ml Lysepuffer für zwei Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen wie zuvor zentrifugiert, mit 1 ml PBS/1% FCS resuspendiert, gezählt und auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Zu jeweils 1×10^6 Zellen wurden die Konjugate bzw. der ungekoppelte Antikörper als

Positivkontrolle in den Konzentrationen 0,1 µg/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml zugegeben und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd für zehn Minuten fixiert oder wahlweise mit 4% PFA/0,5% Saponin fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem sekundären FITC-markierten Antikörper (Goat Anti-Rat-FITC, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) für 20 Minuten bei 4°C gefärbt und für weitere zehn Minuten mit IgG geblockt (Rat-IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). Als Negativkontrollen dienten ungefärbte oder nur mit sekundär-Antikörper gefärbte Proben. Nach dem Waschen der Zellen wurden alle Proben mit anti-CD11c-APC (Caltag, Hamburg) und anti-CD8-PE (BD Biosciences, Heidelberg) gefärbt. Anschließend wurde die CD11c^{high}/CD8⁺-Population anhand der FITC-Färbung der Zellen auf die Bindung der Antikörper und Konjugate am Durchflusszytometer untersucht.

2.1.7.2 Bindung der Konjugate auf Lymphknotenschnitten

Für die Untersuchung der Bindung der Konjugate an Lymphknotenschnitte wurden Lymphknoten aus Mäusen isoliert, in TissueTec O.C.T.TM (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und bei -20°C eingefroren. Anschließend wurden die Lymphknoten am Kryostat (Leica CM1850UV, Leica-Microsystems, Bensheim) geschnitten (5-8 µm), auf Objektträger transferiert und für 20 Minuten mit 4% Paraformaldehyd fixiert. In der folgenden Färbung der Schnitte wurden die Konjugate bzw. der ungekoppelte Antikörper in den Konzentrationen 0,1 µg/ml und 1 µg/ml in IF-Puffer zugegeben und für 20 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde der Sekundärantikörper (Anti-Rat-Alexa-Fluor[®]594, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) zugegeben und für 20 Minuten inkubiert. Als Negativkontrollen dienten ungefärbte oder nur mit sekundär-Antikörper gefärbte Schnitte. Nach dreimaligem Waschen wurden die Schnitte mit Aqua PolyMount (Polysciences, Warrington, PA, USA) eingedeckelt und am Fluoreszenzmikroskop (Leica DM5500B, Filter TX2, Leica-Microsystems, Bensheim) untersucht. Die Aufnahme erfolgte bei für alle Proben gleichen Bedingungen mit Hilfe der Kamera (Spot RTKE) und der Software (Spot Advanced, beide Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA).

IF-Puffer: 0,5% Saponin, 10 mM HEPES pH 7,4, 10 mM Glycin pH 8, 10% normal Goat Serum in RPMI1640.

2.2 Zellkulturtechnische Materialien und Methoden

2.2.1 Medien

Folgende Medien und Zusätze wurden für die Zellkultur verwendet. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, mit 4,5 g/l Glucose, ohne L-Glutamin), RPMI1640 (ohne Glutamin), fetales Kälberserum (Foetal Bovine Serum Gold; vor Verwendung für 45 Minuten bei 56°C inaktiviert), 200 mM Glutamin (100x), HEPES (1 M), Penicillin/Streptomycin (100x), G418 (50 mg/ml), Trypsin /EDTA (alle PAA Laboratories, Pasching, Österreich). PBS (Biochrom, Berlin), Natrium-Pyruvat (Sigma, Taufkirchen).

2.2.2 Plastikwaren

Alle Plastikwaren für die Zellkultur wurden steril bezogen. Folgende Materialien wurden verwendet: 75 cm²-Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht), 150 cm³-Zellkulturflaschen, 6-Schalen-Zellkulturplatten (beide BD Biosciences, Heidelberg), 24-Schalen-Zellkulturplatten (Corning Costar, Bodenheim), 15 ml und 50 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen) und 0,20 µm Sterilfilter (Sartorius, Göttingen).

2.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Für spätere Anwendungen wurden Zellen eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Dem üblicherweise für die Kultur der entsprechenden Zellen verwendeten Medium wurden 10% DMSO zugegeben, die Zellen zu je 1 ml in Kryoröhrchen (Cryo Tube™ Vials, nunc, Wiesbaden) aliquotiert, in den mit Isopropanol befüllten Einfrierbehälter (Cryo 1C Freezing Container, Hereford, UK) gegeben und bei sinkender Temperatur von 1°C/min bis auf -80°C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.4 Zelllinien

2.2.4.1 Hybridomzelllinie für den monoklonalen anti-DEC205-Antikörper

Die Hybridomzelllinie HB290 (American Type Culture Collection, Manassas, VI, USA) sekretiert einen monoklonalen Antikörper gegen den murinen Rezeptor DEC205. Die

Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in 150 cm²-Flaschen kultiviert. Als Medium diente RPMI1640 mit 10% FCS, 2 mM Glutamin, 10 mM HEPES, 1 mM Natrium-Pyruvat und Penicillin/Streptomycin. Die Zellen wurden alle fünf bis sechs Tage im Verhältnis eins zu drei gesplittet und das Medium komplett gewechselt bzw. für die Aufreinigung des Antikörpers gesammelt.

2.2.4.2 Hybridomzelllinie für den monoklonalen anti-CD25-Antikörper

Die Hybridomzelllinie PC61 sekretiert einen monoklonalen Antikörper gegen murines CD25, die alpha-Kette des IL-2-Rezeptors. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in der Zellkultur-Flasche CELLline CL 1000 (INTEGRA Biosciences, Chur, Schweiz) kultiviert. Bei dieser Zellkultur-Flasche wird das Zellkompartiment durch eine semipermeable Membran vom größeren Mediumkompartiment getrennt, um höhere Konzentrationen des Antikörpers im Überstand zu erzielen, der im kleineren Zellkompartiment verbleibt. Als Medium für das Zellkompartiment diente RPMI1640 mit 10% FCS, 2 mM Glutamin, 1 mM Natrium-Pyruvat und Penicillin/Streptomycin. Für das Mediumkompartiment wurde das gleiche Medium, jedoch ohne FCS, verwendet. Die Zellen wurden alle sechs Tage im Verhältnis eins zu zehn gesplittet, das Medium komplett gewechselt und der Überstand aus dem Zellkompartiment für die Aufreinigung des Antikörpers gesammelt.

2.2.4.3 Kultur der GM-CSF produzierende Zelllinie

Die Zelllinie GMPC basiert auf der murinen Makrophagenzelllinie P388 (ATCC, CCL-46), die für den murinen Wachstumsfaktor GM-CSF (macrophage/granulocyte-colony-stimulating-factor) stabil transduziert wurde. Murines GM-CSF wird für die Generierung von Knochenmarks-DCs (BMDCs) aus murinen Knochenmarks-Zellen benötigt. Die GMPC-Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in 150 cm²-Flaschen kultiviert. Als Medium diente RPMI1640 mit 5% FCS, 2 mM Glutamin, 10 mM HEPES und Penicillin/Streptomycin. Die Zellen wurden alle fünf bis sechs Tage im Verhältnis eins zu drei gesplittet und das Medium komplett gewechselt bzw. die Überstände für die Verwendung in BMDC-Kulturen gesammelt. Vor dem Lagern bei -20 oder -80°C wurden die Überstände an BMDC-Kulturen getestet.

2.2.5 Durchflusszytometrie

Für die Untersuchung von Oberflächenmarkern und intrazellulären Proteinen wurde die Durchflusszytometrie angewendet. Als Instrument diente das FACS-Gerät FACSCanto™ (BD Biosciences, Heidelberg) mit einem blauen Laser (488 nm, 20 mW) und einem roten Laser (633 nm, 17 mW HeNe). Folgende Fluoreszenzfarbstoffe kamen zum Einsatz: Die mit dem blauen Laser angeregten Farbstoffe Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC, $E_{m_{max}}$: 519 nm), Phycoerythrin (PE, $E_{m_{max}}$: 578 nm) und Peridin-Chlorophyll-Protein-Cyanin5.5 (PerCP-Cy5.5, $E_{m_{max}}$: 695 nm), und der mit dem roten Laser angeregte Farbstoff Allophycocyanin (APC, $E_{m_{max}}$: 660 nm). Zur Markierung der Oberflächenmarker wurden die Antikörper CD11c-APC, CD4-APC, CD8-APC, ISO-PE, CD40-PE, ISO-FITC (alle Caltag, Hamburg), CD45.1-Biotin, Streptavidin-PerCP-Cy5.5, CD4-FITC, MHC II-PE, CD80-PE (alle BD Biosciences, Heidelberg), CD86-PE, B7-H1-PE, B7-H3-PE, B7-H4-PE, B7-DC-PE, CD69-PE, (alle eBiosciences, San Diego, CA, USA) und CD25-PE (7D4, Beckman-Coulter, Krefeld) verwendet. Die Inkubation erfolgte für rund 30 Minuten bei 4°C. Das intrazelluläre FoxP3 wurde nach Permeabilisieren und Fixieren der Zellen nach Herstellerangaben (mFoxP3-Kit, eBiosciences, San Diego, CA, USA) mit FoxP3-FITC gefärbt und gemessen.

2.2.6 ELISPOT

Der ELISPOT-Assay wurde durchgeführt, um die TagIV spezifische CD8⁺-T-Zellreaktion zu bestimmen. Beim ELISPOT-Assay werden Membranboden-Zellkulturplatten mit Antikörpern beschichtet, die für ein von den Zellen sekretiertes Protein, in diesem Fall IFN-gamma, spezifisch sind. Bei der anschließenden Zellkultur wird das von den Zellen sekretierte IFN-gamma von den Antikörpern gebunden. Nach Entfernen der Zellen wird ein weiterer, biotinylierter Antikörper zugegeben, der ebenfalls an die sekretierten Proteine bindet. Nach der Zugabe von Streptavidin/HRPO (horse radish peroxidase) können die IFN-gamma-produzierenden T-Zellklone mit Hilfe des im Anschluss ebenfalls zugegebenen DAB-Substrats (3,3-Diaminobenzidin) sichtbar gemacht werden. Dabei wird das Substrat vom Enzym (HRPO) zu einem sichtbaren Farbstoff umgewandelt.

2.2.6.1 Isolation der Milzzellen

Vor Bestimmung der TagIV spezifischen CD8⁺-T-Zellreaktion wurden die Mäuse entsprechend dem jeweils angegeben Vakzinierungsprotokoll behandelt. Nach Entnahme der Milz wurde diese durch einen 70 µm Zellsieb gedrückt und bei 4°C und 1300 U/min für sieben Minuten zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes, Resuspendierung der Zellen mit 2 ml Lysepuffer pro Milz und einer Inkubation von 2 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen wie zuvor zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1 ml R5-Medium resuspendiert, gezählt und auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt.

2.2.6.2 Restimulierung der Milzzellen

Zu Beginn wurden die ELISPOT-Platten (MAHAS4510, Millipore, Schwalbach) mit anti-IFN-gamma-Antikörpern beschichtet (purified rat anti-mouse IFN-gamma, Pharmingen/BD Biosciences, Heidelberg). Dafür wurden die Platten mit 10 µg/ml Antikörper in PBS, 100 µl/Schale für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Platten dreimal mit R5-Medium gewaschen, gefolgt von einer zweistündigen Inkubation mit 100 µl R5-Medium pro Schale, bei 37°C für 2 Stunden, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Nach Entfernen des R5-Mediums wurden 100 µl der Milzzellsuspension (1×10^6 Zellen) in jede Schale gegeben. Zusätzlich wurden 100 µl /Schale R5-Medium mit IL-2 (25 units/µl, R&D-Systems, Wiesbaden) und 1µM TagIV-Peptid zugegeben. Als Kontrolle diente R5-Medium mit IL-2. Die Platten wurden dann für 24 Stunden bei 37°C (5% CO₂) inkubiert.

2.2.6.3 Detektion der Interferon-gamma-Produktion

Nach Entfernen der Zellen und dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden die Platten mit biotinyliertem IFN-gamma-Antikörper (50 µl/Schale, 5 µg/ml Assaypuffer, Biotin rat anti-mouse IFN-gamma, Pharmingen/BD Biosciences, Heidelberg) für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden 100 µl/Schale SA-POD (Streptavidin-horse radish peroxidase, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA, 1:2000) zugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurden die Platten nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer mit DAB nach Herstellerangaben entwickelt (DAB staining kit, vector, Wertheim) und die grauen Spots unter dem Makroskop

(S6E, Leica-Microsystems, Bensheim) ausgezählt. Aus den Mehrfachbestimmungen (mindestens Triplets) wurden die Mittelwerte bestimmt.

R5-Medium: 5% FCS, 2 mM Glutamin, 10 mM HEPES und Penicillin/Streptomycin in RPMI 1640.

Waschpuffer: 0,1 % Tween 20 in PBS.

Assaypuffer: 0,5% BSA (bovine serum albumin Fraction V), 0,05% Tween 20 in PBS.

2.2.7 Generierung von dendritischen Zellen aus Knochenmark

Das Knochenmark für die BMDC-Kulturen (bone marrow derived dendritic cells) wurden aus den Femuren von C57Bl/6-Mäusen gewonnen. Nach Isolation der Femure wurde mit Hilfe einer Spritze mit aufgesetzter Kanüle (0,6x25 mm, B.Braun, Melsungen) das Knochenmark mit PBS aus den Femuren in Petrischalen (10 cm, BD Biosciences, Heidelberg) gespült. Einzelzellsuspensionen wurden durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren des Knochenmarks gewonnen. Nach einer siebenminütigen Zentrifugation bei 1300 U/min und 4°C wurden die Zellen zur Lyse der Erythrozyten in 2 ml Lysepuffer resuspendiert und für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Auffüllen mit PBS wurden die Zellen erneut zentrifugiert, der Überstand entfernt und in 1 ml R5-Medium resuspendiert. Nach dem Zählen der Zellen (Neubauer-zählkammer improved, Hecht, Sondheim) wurden die Zellen mit GM-CSF-haltigem R5-Medium auf 1×10^6 Zellen pro ml eingestellt und in 24-er Zellkulturplatten zu je 1 ml pro Schale gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Am Tag drei wurden die nicht-adhärenenten neugebildeten Granulozyten durch leichtes Spülen mit GM-CSF-haltigem R5-Medium entfernt und, wie oben beschrieben, weiter kultiviert. Am Tag fünf wurde das Medium durch frisches ersetzt. Am siebten Tag wurden die generierten BMDCs durch leichtes Spülen aus den Schalen gewaschen und für den weiteren Gebrauch in 6-er Zellkulturplatten transferiert.

2.3 Tierexperimentelle Methoden

2.3.1 Mäuse

C57Bl/6-Mäuse (H-2^b) und C3HeN-Mäuse (H-2^k) wurden von Charles River (Sulzfeld) im Alter von sechs Wochen geliefert und im Alter zwischen sechs und zwölf Wochen für die Versuche eingesetzt.

CD45.1-transgene B6.SJL-Mäuse (H-2^b) wurden von Taconic (Ry, Dänemark) im Alter von sechs Wochen geliefert und im Alter zwischen sechs und zwölf Wochen für die Versuche eingesetzt.

C3HeBFe-Mäuse (H-2^k), die TCR-transgenen TCRCD8⁺- und TCR1-Mäuse (C3H) und die Mäuse der F1-Generation von RIP1-Tag5 (C3H) und C57Bl/6-Mäusen wurden im Zentralen Tierlabor des Deutschen Krebsforschungszentrums gezüchtet und gehalten.

2.3.2 Analyse der Aktivität der zytotoxischen T-Zellen *in vivo*

Um die Effektivität der Immunisierung zu überprüfen, wurden vakzinieren Mäusen Peptid-beladene Milzzellen injiziert und die Abnahme der injizierten, Peptid-beladenen Zellen nach 24 Stunden quantifiziert. Das für die Beladung verwendete Peptid entspricht dem Epitop, gegen welches zuvor vakziniert wurde. Die Abnahme („kill“) der beladenen gegenüber den nicht beladenen, ebenfalls injizierten Zellen spiegelt so die „Killeraktivität“ der aktivierten zytotoxischen T-Zellen wider. Zur Wiederfindung der injizierten Milzzellen wurden diese zuvor mit unterschiedlich konzentriertem Carboxy Fluorescein Succinimidyl Ester (CFSE; CellTrace™ Cell Proliferation Kit, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) gefärbt.

2.3.2.1 Beladung und Injektion der Zellen

Eine Woche nach der Vakzinierung wurden Milzen aus unbehandelten Mäusen isoliert. Anschließend wurden die Milzen durch einen 70 µm Zellsieb gegeben und die Einzelzellsuspension bei 1300 U/min und 4°C für sieben Minuten zentrifugiert. Nach der Lyse der Erythrozyten mit 2 ml Lysepuffer für zwei Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen erneut zentrifugiert, in 1 ml PBS resuspendiert, gezählt und auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Nach Aufteilen der Zellen in zwei gleichgroße Fraktionen wurde zu einer Zellfraktion zur Beladung der Zellen das

entsprechende Peptid mit einer Endkonzentration von 1 μM zugegeben. Die andere Gruppe diente als Kontrolle und blieb unbehandelt. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei 37°C wurden die Zellen durch Zugabe von unterschiedlichen Mengen CFSE gefärbt. Den unbeladenen Kontroll-Zellen wurde CFSE in einer Endkonzentration von 0,1 μM zugegeben, den Peptid-beladenen Zellen 1 μM . Beide wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit RPMI1640/10%FCS und zweimal mit PBS gewaschen, erneut gezählt und in gleichem Verhältnis gemischt. Im Falle der Untersuchung von zwei Epitopen (z.B. TagIV_(404-411; C-L) und TagIV₍₄₀₄₋₄₁₁₎ oder TagIV_(404-411; C-L) und beta-Gal₍₉₆₋₁₀₃₎) wurden dementsprechend die isolierten Milzzellen in drei Fraktionen aufgeteilt und mit CFSE in den Konzentrationen 0,08 μM , 0,5 μM und 3 μM gefärbt. Zur Kontrolle wurden die gepoolten Zellfraktionen vor Injektion mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf das Mischungsverhältnis hin untersucht. Es wurden dann 1×10^7 Zellen pro Epitop bzw. Kontrolle und Maus in 100-200 μl PBS in die Schwanzvene der eine Woche zuvor immunisierten Mäuse injiziert.

2.3.2.2 Analyse des spezifischen „Kills“

Einen Tag nach Injektion der Milzzellen wurden die axillaren und brachialen Lymphknoten und die Milz entnommen und getrennt analysiert. Dafür wurden die Lymphknoten bzw. die Milzen durch einen 70 μm Zellsieb gegeben um Einzelzellsuspensionen zu erhalten. Anschließend wurden die Zellen für sieben Minuten bei 1300 U/min und 4°C zentrifugiert. Bei den Milzzellen schloss sich eine Erythrozytenlyse mit 2 ml Lysepuffer für zwei Minuten bei Raumtemperatur an. Danach wurden die isolierten Lymphknoten- bzw. Milz-Zellen mit Propidium Iodid (PI; 1/200, BD Biosciences, Heidelberg) versetzt und im Durchflusszytometer gemessen. Es wurden die PI-negativen/CFSE-positiven Zellen aufgenommen und die unterschiedlich intensiv CFSE-gefärbten Zellpopulationen getrennt gezählt. Mit Hilfe des Verhältnisses $\% \text{CFSE}^{\text{low}} / \% \text{CFSE}^{\text{high}}$ wurde der prozentuale, spezifische „kill“ berechnet ($1 - (\text{Verhältnis immunisiert} / \text{Verhältnis Kontrolle}) \times 100$).

2.3.3 Untersuchung der Proliferation *in vivo*

Zur Untersuchung der Proliferation der zytotoxischen T-Zellen (CD8^+) und der Helfer-T-Zellen (CD4^+) nach der Immunisierung mit den Konjugaten wurde ein *in vivo*-Proliferationsassay durchgeführt. Dafür wurden T-Zellen aus T-Zellrezeptor-

transgenen Mäusen isoliert und nach CFSE-Färbung in naive Mäuse transferiert. Nach anschließender Immunisierung wurden die T-Zellen nach 46 Stunden wieder isoliert und anhand ihrer CFSE-Färbung auf ihre Proliferation hin untersucht. Der Farbstoff CFSE bindet an freie Amine der Zytoplasmaproteine und verteilt sich bei der Zellteilung dementsprechend gleichmäßig auf beide Tochterzellen, wobei sich die Intensität der Fluoreszenz pro Zelle halbiert. Des Weiteren wurde die Interferon-gamma- (IFN-gamma) Produktion mittels FACS-Analyse bestimmt. Die Experimente wurden am Deutschen Krebsforschungszentrum durchgeführt.

2.3.3.1 T-Zell-Transfer und Immunisierung

Zur Isolation von T-Zellen wurden Milzen aus T-Zell-Rezeptor-transgenen Mäusen entnommen und die T-Zellen über magnetische Zellseparation (MACS) aufgereinigt. Dafür wurden die Milzen durch ein Sieb gegeben und die so erhaltene Einzelzellsuspension mit den Antikörper-Magnetbeads nach Herstellerangaben inkubiert. Über Magnetsäulen (MACS[®] Cell Separation Columns, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) wurden dann die Magnetbead-gekoppelten T-Zellen von den restlichen Zellen abgetrennt. Im Einzelnen wurden die CD4-positiven Zellen aus den Milzen der TagTCR1-Mäuse isoliert (CD4 (L3T4) Micro Beads, mouse, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach), deren transgener T-Zellrezeptor mit Tag-Epitop (Tag₃₆₂₋₃₈₄; TNRFNDLLDRMDIMFGSTGSADI) beladene MHC II-Moleküle (I-A) erkennt. Die TCR-transgenen CD8-positiven Zellen, die das MHC I-präsentierte (H-2K^k) Tag-Epitop (Tag₅₆₀₋₅₆₈; SEFLLEKRI) erkennen wurden aus TCRCD8⁺-Mäusen isoliert (CD8a (Ly-2) Micro Beads, mouse, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach).

Anschließend wurde die Reinheit und der Anteil der transgenen T-Zellen mit dem Durchflusszytometer bestimmt und die zu transferierenden Zellen mit CFSE gefärbt. Dafür wurden die Zellen für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit 1 µM CFSE inkubiert, einmal mit RPMI/10% FCS und zweimal mit PBS gewaschen. Nach Einstellen der Zellen auf jeweils 1×10^7 /ml wurden die CFSE-gefärbten, TCR-transgenen CD4-positiven und CD8-positiven Zellen im Verhältnis 1:1 gemischt und 1×10^6 Zellen pro Zelltyp und Maus in die Schwanzvene naiver C3HeBFe-Mäusen injiziert.

Am darauf folgenden Tag wurden die Mäuse wie angegeben subkutan immunisiert. Als Kontrollen dienten eine Maus ohne T-Zelltransfer, eine Maus mit T-Zelltransfer ohne Immunisierung und eine Maus mit transferierten T-Zellen und Peptid-

Immunisierung (jeweils 100 µg Tag-Peptid₃₆₂₋₃₈₄ und Tag-Peptid₅₆₀₋₅₆₈ plus 50 µg CpG) als Positivkontrolle.

2.3.3.2 Bestimmung der Proliferation und der Interferon-gamma-Expression

46 Stunden nach der Immunisierung wurden die drainierenden Lymphknoten (brachial und axial) isoliert und zur Herstellung einer Einzelzellsuspension durch einen 70 µm Zellsieb gegeben. Jeweils 5×10^6 Zellen wurden gemeinsam mit Golgi-Plug (1/1000, BD Biosciences, Heidelberg) und Tag-Peptid₃₆₂₋₃₈₄ (1 µM) oder Tag-Peptid₅₆₀₋₅₆₈ (1 µM) in 200 ml Medium (RPMI/10% FCS) in 96-er Zellkulturplatten (U-Boden) transferiert und für drei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für die Untersuchung im Durchflusszytometer gefärbt. Für die Untersuchung der CD4-positiven Zellen wurden die Antikörper 9H5-PE (von I. Förster) und CD4-PerCP/Cy5.5 verwendet. Die CD8-positiven Zellen wurden mit CD8-PerCP/Cy5.5 und Vb8.1/8.2-PE (alle BD Biosciences, Heidelberg) gefärbt. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen dreimal mit 200 µl FACS-Puffer (PBS/1% FCS) gewaschen und mit 100 µl Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, Heidelberg) für weitere zehn Minuten auf Eis fixiert und permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit Cytoperm/Cytowash (BD Biosciences, Heidelberg) wurden die Zellen mit IFN-gamma-APC-Antikörper (BD Biosciences, Heidelberg) für 45 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Cytoperm/Cytowash wurden die Zellen mit 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und am Durchflusszytometer (FACSCantoII®, BD Biosciences, Heidelberg) gemessen.

2.3.4 Tumormodelle

2.3.4.1 Subkutaner RMA-Tag-Tumor

Die für das Large T Antigen transgene RMA-Tag-Tumorzelllinie stammt von der RMA-Tumorzelllinie, einem T-Zelllymphom (C57Bl/6) ab. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in RPMI1640 mit 10% FCS, 2 mM Glutamin und Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ in 75 cm²-Zellkulturflaschen. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt und die Zellen eins zu zehn gesplittet. Als Selektionsmarker wurde G418 in der Konzentration 500 µg/ml zugegeben.

Zum Setzen eines Tumors wurden die Zellen mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen pro ml in PBS resuspendiert und jeweils 50 μ l pro Maus (1×10^5 Zellen) auf dem Rücken subkutan injiziert.

2.3.4.2 Subkutaner B16-Tag-Tumor

Bei der B16-Tag-Tumorzelllinie handelt es sich um eine für das Large T Antigen transgene B16-Melanomzelllinie im C57Bl/6 Hintergrund. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM ohne Glutamin mit 10% FCS, 2 mM Glutamin und Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ in 75 cm²-Zellkulturflaschen. Die Zellen wurden nach kurzem Waschen mit PBS mit Trypsin/EDTA abgelöst, eins zu zehn gesplittet und in frischem Medium aufgenommen. Als Selektionsmarker wurde G418 in der Konzentration 1000 μ g/ml zugegeben.

Zum Setzen eines Tumors wurden die abgelösten Zellen mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen pro ml in PBS resuspendiert und jeweils 50 μ l pro Maus (1×10^5 Zellen) auf dem Rücken subkutan injiziert.

2.3.4.3 Subkutaner BMT9-Tag-Tumor

Bei der BMT9-Tag-Tumorzelllinie handelt es sich um eine für das Large T Antigen transgene Fibrosarcomazelllinie (BMT9 oder auch AG104A) im C3H Hintergrund. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM ohne Glutamin mit 10% FCS, 2 mM Glutamin und Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ in 75 cm²-Zellkulturflaschen. Die Zellen wurden nach kurzem Waschen mit PBS mit Trypsin/EDTA abgelöst, eins zu zehn gesplittet und in frischem Medium aufgenommen. Als Selektionsmarker wurde G418 in der Konzentration 500 μ g/ml zugegeben.

Zum Setzen eines Tumors wurden die abgelösten Zellen mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen pro ml in PBS resuspendiert und jeweils 50 μ l pro Maus (1×10^5 Zellen) auf dem Rücken subkutan injiziert.

2.3.4.4 Autochthones RIP1-Tag5-Tumormodell

Im autochthonen RIP1-Tag5-Tumormodell wird in den transgenen Tieren das Large T Antigen (Tag-Protein) unter der Kontrolle des Ratteninsulinpromotors (RIP) organspezifisch in den beta-Zellen des Pankreas exprimiert. Die Expression beginnt im Alter von zehn Wochen. In der 16. Woche kommt es zum „angiogenic switch“, der

Veränderung der Vaskularisierung in der Umgebung des entstehenden Tumors. Im Alter von 23 Wochen tragen die Mäuse einen soliden Tumor, der zudem zum Krankheitsbild der Hypoglykämie führt, an dem die Mäuse ohne Behandlung im Alter von ca. 32 Wochen sterben. Für die Versuche kamen Mäuse der F1-Generation von RIP1-Tag5- und C57Bl/6-Mäusen zum Einsatz. Tumorentwicklung und Überlebensdauer sind in der F1-Generation identisch mit RIP1-Tag5-Mäusen.

2.3.5 Vakzinierung tumortragender Mäuse

Die Mäuse wurden mit einem „therapeutischen Setup“ behandelt, d.h. die tumortragenden Mäuse (mit transplantierbaren, subkutanen Tumoren) wurden das erste Mal behandelt nachdem der Tumor in allen Mäusen des Versuchs deutlich sichtbar war. Zu diesem Zeitpunkt, Tag sechs oder Tag sieben nach Setzen des Tumors, hatten die Tumoren eine Größe von ca. 25 mm³. Zur Behandlung wurden den Mäusen 50 µg CpG (CpG ODN 1826, 5'-TCCATGAcgTTCCTGAcgTT-3', MWG BIOTECH, Ebersberg), 50 µg poly I:C (Amersham Biosciences, Freiburg) plus 5 µg Konjugat bzw. im Falle der Kontrollgruppen plus PBS oder 5 µg Tag-Protein subkutan injiziert. Diese Behandlung wurde, wenn nicht anders angegeben, alle vier bis fünf Tage bis zum Ende des Versuchs wiederholt.

2.3.6 Depletion der regulatorischen T-Zellen

Zur Depletion der regulatorischen T-Zellen wurden 300 µg des anti-CD25-Antikörpers (PC61) intraperitoneal (i.p.) injiziert. Im Falle der Behandlung von tumortragenden Mäusen erfolgte die erste Injektion nach dem Sichtbarwerden der Tumoren, einen Tag vor der ersten Vakzinierung. Im Falle einer weiteren Behandlung wurde nach drei erfolgten Vakzinierungen bzw. nach 14 Tagen erneut injiziert, ebenso einen Tag vor der darauffolgenden Vakzinierung.

2.3.7 Isolierung von Zellen aus dem Tumorgewebe

Für weitergehende Untersuchungen im Durchflusszytometer wurden die Zellen aus dem Tumorgewebe der subkutanen Tumoren isoliert.

Nach Herausschneiden des Tumors aus der Haut wurde dieser mit Kanülen (0,6x25 mm, B.Braun, Melsungen) zerstückelt und für 15 Minuten in Tumorlysepuffer bei 37°C inkubiert, um die Kollagenstruktur aufzulösen. Anschließend wurde das

Gemisch durch einen 70 µm Zellsieb gegeben und nach dem Zentrifugieren für sieben Minuten bei 1300 U/min und 4°C in PBS/1% FCS resuspendiert.

Tumorlyespuffer: 0,5% Kollagenase TypIV (Worthington, Lakewood, NJ, USA), 0,05% DNase (Roth, Karlsruhe), in PBS/1% FCS.

2.3.8 Behandlung der autochthonen Tumoren

Zur Behandlung der Tumor-tragenden Mäuse des autochthonen Tumormodels RIP1-Tag5 wurden diese ab einem Alter von 22-25 Wochen behandelt. Den Mäusen wurden entweder 5 µg anti-DEC205-Tag-Konjugat oder 50 µg Tag-Protein mit jeweils 50 µg CpG s.c. einmal pro Woche injiziert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Mäuse. Wahlweise wurden die Mäuse jeweils drei Tage nach der Vakzinierung mit CpG behandelt, um das Tumorendothel zu aktivieren. Dies erfolgte durch Injektion von 50 µg CpG i.p.

Die Versuche wurden am Deutschen Krebsforschungszentrum, Abteilung Molekulare Immunologie durchgeführt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Klonierung der ScFv-Fusionsantikörper

Die hier angewendete Methode zur Herstellung der „Single chain Fragment variable“-Antikörper (ScFv-Antikörper) wurde von R. Kontermann (Institut für Zellbiologie und Immunologie, Universität Stuttgart) und D. Nettelbeck (Angewandte Tumorstudiologie, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg) übernommen. Dabei werden mittels reverser Transkription der Hybridomzell-RNA und der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) die für die variablen Regionen der Antikörper kodierenden Gen-Fragmente amplifiziert. Die variablen Regionen der leichten und schweren Kette des Antikörpers werden über Linker miteinander verknüpft und können mit einem weiteren für ein Protein oder Peptid kodierenden DNA-Fragment zur späteren Expression eines Fusionsantikörpers verbunden werden. Das Produkt, der Fusionsantikörper, besteht dann aus einer Bindungsregion, bestehend aus den variablen Regionen der leichten und schweren Kette des nativen Antikörpers, entsprechend eines variablen „single chain“-Fragments und einem fusionierten Peptid oder Protein am C-terminalen Ende des Konstrukts.

2.4.2 Isolierung der RNA aus Hybridomzellen

Für die Generierung der ScFv-Fusionsantikörper wurde die RNA aus Hybridomzellen gewonnen, um nach anschließender reverser Transkription die DNA-Fragmente der variablen Regionen mittels PCR amplifizieren zu können. Dafür wurde eine RNA-Mini-Präparation zur Aufreinigung der RNA durchgeführt.

Für die Durchführung der RNA-Präparation wurden 1×10^7 Zellen der entsprechenden Hybridomzellkultur zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen nach der Lyse über den QIAshredder™ (Qiagen, Hilden) gegeben. Die RNA-Aufreinigung wurde mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des beigefügten Protokolls (RNeasy® Mini Handbook 2001) durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 30 µl H₂O.

2.4.3 Reverse Transkription

Die wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben gewonnene RNA wurde für die anschließende PCR mittels reverser Transkription in DNA umgeschrieben.

Dafür wurde das Sensiscript® RT Kit von Qiagen (Hilden) nach den Abgaben des Herstellers angewendet.

2.4.4 PCR zur Generierung der Variablen Regionen

Für die PCR zur Generierung der variablen Regionen wurden degenerierte Primer verwendet (Sequenzen s. Anhang), um die Unterschiede in den relativ konservierten Bereichen, an denen die Primer binden, auszugleichen. Dafür standen verschiedene Primerkombinationen zur Verfügung, ein Vorwärts- und zwei Rückwärtsprimer für die schweren Ketten und zwei Vorwärts- und drei Rückwärtsprimer für die leichten kappa-Ketten. Primer für lambda-Ketten wurden nicht benötigt. Die PCR-Bedingungen wurden stark variiert und den entsprechenden Primerpaaren angepasst. Als Polymerase kam die Phusion™-Polymerase (Finnzymes/New England BioLabs, Frankfurt) und das Gerät T-Gradient (Biometra, Göttingen) zum Einsatz. Nach der PCR wurden die Produkte über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, die Fragmente entsprechender Größe ausgeschnitten und für die weitere Klonierung aufgereinigt. Die weiteren Klonierungsschritte zur Herstellung der Expressionsplasmide mit den variablen Regionen wurden von Theron Johnson durchgeführt.

2.4.5 Restriktionsverdau

Die Restriktionsverdau dienten zum einen der Identifizierung und Kontrolle von Plasmid-DNA, zum anderen der Erzeugung von DNA-Fragmenten zur Klonierung derselben.

Für die Durchführung der Verdau wurden der entsprechende Reaktionspuffer 10x, falls erforderlich bovine serum albumin (BSA; Endkonzentration 100 µg/ml), das Restriktionsenzym (alle New England BioLabs, Frankfurt) und Plasmid-DNA in ein Reaktionsgefäß zusammengegeben, mit H₂O auf das Endvolumen aufgefüllt und gut durchmischt. Zur Identifizierung und Kontrolle von Plasmid-DNA wurde ein Endvolumen von 20 µl (für 1-2 µg Plasmid-DNA) gewählt und für die Erzeugung von DNA-Fragmenten zur Klonierung 50 µl (für 5 µg Plasmid-DNA).

Die Temperatur und die Dauer der Inkubation wurden nach Herstellerangaben gewählt. Im Anschluss daran wurden die DNA-Fragmente über Agarosegel-Elektrophorese (Kap. 2.4.6) aufgetrennt.

2.4.6 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Auftrennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten wurde sowohl nach Restriktionsverdau als auch nach PCR-Reaktionen eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt.

Bei der Elektrophorese kamen ausschließlich 1%-ige Agarosegele (1% Agarose, Eurogentech, Brüssel, Belgien; in 1x TAE-DNA-Puffer) mit Ethidiumbromidfärbung (5 µl/100 ml Agarosegel) zum Einsatz. Als Laufpuffer diente 1x TAE-DNA-Puffer und für die Bestimmung der DNA-Fragmentlängen wurde der Größenmarker 2-log-DNA-Ladder (New England BioLabs, Frankfurt) verwendet. Vor dem Aufbringen in die Geltaschen wurden die Proben mit 6x Ladepuffer versetzt. Die elektrische Spannung bei der Durchführung der Agarosegel-Elektrophorese betrug 120 Volt.

Die Visualisierung der Ethidiumbromid-gefärbten DNA-Fragmente erfolgte über das Imagingsystem (biorad, München; Kamera Spot RT3/Software Spot Advanced, Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA).

TAE-DNA-Puffer: 0,04 M Tris Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0.

6x Ladepuffer: 1,25 ml 2% Bromphenolblau, 3 ml Glycerol, 1 ml 10x TAE-Puffer und 4,75 ml H₂O.

2.4.7 DNA-Aufreinigung aus dem Agarosegel

Nach dem Herausschneiden der gewünschten DNA-Fragmente aus den Agarosegelen wurde die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) entsprechend den Angaben des Herstellerprotokolls (QIAquick Spin Handbook 07/2002) aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit 30 µl H₂O.

2.4.8 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurden photometrische Messungen durchgeführt.

Vor dem Messen mit dem Photometer Helios gamma (Unicam, Cambridge, UK) wurde die DNA auf 1/10 mit H₂O verdünnt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Konzentration der doppelsträngigen DNA wurde

anschließend anhand der gemessenen Absorption ($Abs_{260\text{ nm}}$) mit folgender Formel errechnet:

$$\text{dsDNA-Konz.} = Abs_{260\text{ nm}} \times OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$\text{dsDNA-Konz. } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = Abs_{260\text{ nm}} \times 0,050\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l} \times 100$$

Es wurde jeweils der Mittelwert aus drei Messungen ermittelt.

2.4.9 Dephosphorylierung von Vektoren

Um eine Religierung der geschnittenen Vektoren zu verhindern, wurden die offenen Enden der Vektoren dephosphoryliert.

Für die Dephosphorylierungsreaktion wurden 1 μl „calf intestinal phosphatase“ (CIP), 1 μl NEB3 10x Reaktionspuffer (beide New England BioLabs, Frankfurt) und 1 μg geschnittene Plasmid-DNA in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammengeben, auf 10 μl Gesamtvolumen mit H_2O aufgefüllt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

2.4.10 Ligation

Die Inserts wurden mit den Enden der Vektoren ligiert.

Für die Ligation wurden 1 μl T4 DNA Ligase (3 $\text{u}/\mu\text{l}$), 1 μl Ligase 10x Puffer (New England BioLabs, Frankfurt), 150 ng Vektor, das Insert im molaren Verhältnis von 1/3 (Vektor/Insert) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und mit H_2O auf 10 μl aufgefüllt. Alternativ wurde die Quick-Ligase (New England BioLabs, Frankfurt) verwendet. Die eingesetzten Mengen der Vektoren bzw. Inserts wurden über folgende Gleichung errechnet.

$$\text{ng Vektor} \times \text{kb Insert} / \text{kb Vektor} \times \text{mol. Verh. Insert} / \text{Vektor} = \text{ng Insert}$$

Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht oder unter Verwendung der Quick-Ligase bei Raumtemperatur für 5-10 Minuten.

2.4.11 Klonierung über Adenin-Überhänge

Für die Klonierung von PCR-Produkten (Kap. 2.4.4) wurden diese zuerst in das LacZ-Gen des pCR2.1-Vektors (Invitrogen, Karlsruhe) eingebaut. Dafür werden Adenin-Überhänge benötigt. Wenn das PCR-Produkt mit der Phusion-Polymerase generiert wurde, folgte eine kurze Reaktion mit einer Taq-Polymerase (Bioron,

Heidelberg). Wenn das PCR-Produkt direkt mit einer Taq-Polymerase generiert wurde, war dies nicht notwendig. Durch den Einbau der PCR-Produkte in das LacZ-Gen des pCR2.1-Vektors war eine anschließende Blau-Weiß-Selektion möglich.

Zum Generieren der Adenin-Überhänge wurden 1 µl 10x PCR Puffer, 1 µl 2 mM dNTPs, 2,5 U TAQ DNA Polymerase (alle Bioron, Heidelberg) und 5 µl aufgereinigtes PCR-Produkt zusammengegeben und mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für 10 min bei 72°C in der PCR Maschine (Gradient T, Biometra, Göttingen). Für die anschließende Ligation wurden 0,5 µl des PCR-Produkts mit Adenin-Überhängen, 1 µl 10x T4-Ligationspuffer, 1 µl T4-Ligase, 2 µl pCR2.1-vector (alle Invitrogen GmbH, Karlsruhe) und 5,5 µl H₂O vorsichtig gemischt und über Nacht bei 14°C inkubiert.

Nach dem Auftauen von Top10-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) auf Eis wurden 5 µl der Ligation zu den Top10-Zellen dazugegeben, vorsichtig gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss an eine weitere Inkubation bei 42°C für 30 Sekunden wurde die Reaktion sofort wieder auf Eis gestellt und 1 ml SOC Medium hinzugegeben. Danach folgte die Inkubation der transformierten TOP10-Zellen im Schüttler bei 37°C und 200 U/min für 1 Stunde. Die Bakteriensuspension wurde dann bei 3000 U/min für eine Minute zentrifugiert, der Überstand bis auf ca. 150 µl abgenommen und nach Resuspension der Transformationsreaktion auf zuvor mit Ampicillin und X-Gal behandelte LB-Platten ausplattiert. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C wurden am Folgetag pro Ansatz ca. 10 weiße Kolonien gepickt, die Plasmide isoliert (Kap. 2.4.14) und durch Restriktionsverdau analysiert.

SOC-Medium: 2% Tryptone, 0,5% Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCL, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose.

2.4.12 Transformation

Zur Amplifizierung von Plasmiden wurden NEB5α-Bakterien (New England BioLabs, Frankfurt), ein DH5α-Bakterienstamm, verwendet.

5 µl der zu amplifizierenden DNA wurden zu 50 µl auf Eis aufgetauten NEB5α-Bakterien zugegeben und für ca. 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss an eine weitere Inkubation bei 42°C für 30 Sekunden wurde die Reaktion sofort wieder auf Eis gestellt und 1 ml SOC Medium hinzugegeben. Danach folgte die Inkubation der transformierten Zellen im Schüttler bei 37°C und 200 U/min für 1 Stunde. Die

Bakteriensuspension wurde dann bei 3000 U/min für eine Minute zentrifugiert, der Überstand bis auf ca. 150 µl abgenommen und nach Resuspension der Transformationsreaktion auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin oder Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurden die Plasmide von 16-64 Kolonien mit Hilfe der PCR analysiert und, wenn positiv, über Plasmid-Präparation (Kap. 2.4.14) isoliert und gegebenenfalls durch Restriktionsverdau (Kap. 2.4.5) weiter analysiert.

2.4.13 PCR zur Analyse von Plasmiden

Die PCR wurde zur schnellen Analyse einer großen Anzahl von Klonen durchgeführt. Zu Beginn wurde eine Stocklösung in ausreichender Menge angesetzt. Für jeden zu analysierenden Klon wurden 20 µl, bestehend aus 2 µl 10x-Puffer, 0,5 µl Taq-Polymerase, 0,5 µl dNTPs (alle Bioron, Heidelberg), jeweils 0,5 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (s. Anhang, MWG-Biotech, Ebersberg) und 16 µl H₂O angesetzt und auf die Reaktionsgefäße verteilt. Die gepickten Klone wurden zur Analyse in ein wie oben beschrieben vorbereitetes PCR-Reaktionsgefäß gegeben und zusätzlich für die weitere Inkubation auf eine entsprechend unterteilte LB-Agar-Platte mit Ampicillin. Die PCR umfasste 30 Zyklen, wobei 62°C als Annealingtemperatur gewählt wurde. Die Dauer der Polymerisationsphase wurde der jeweils erwarteten Fragmentlänge angepasst. Im Anschluss wurden die Fragmente mittels Agarosegel-Elektrophorese visualisiert (Kap. 2.4.6).

2.4.14 Mini-Präparation zur Plasmid-DNA-Isolation

Bei Bedarf kleinerer Mengen an Plasmid-DNA nach einer Transformation wurde eine Plasmid-Mini-Präparation zur Aufreinigung der DNA durchgeführt.

Für die Durchführung der Plasmid-Mini-Präparation wurde eine 5 ml Übernachtskultur der Bakterien in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angesetzt. Am darauf folgenden Tag konnte die Präparation mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) entsprechend den Angaben des Herstellerprotokolls (QIAprep Miniprep Handbook 07/2002) durchgeführt werden. Die Elution erfolgte mit 30 µl H₂O.

2.4.15 Maxi-Präparation zur Plasmid-DNA-Isolation

Bei Bedarf größerer Mengen an Plasmid-DNA nach einer Transformation wurde eine Plasmid-Maxi-Präparation zur Aufreinigung der DNA durchgeführt.

Für die Durchführung der Plasmid-Maxi-Präparation wurde eine 100 ml Übernachtkultur der Bakterien in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angesetzt. Am darauf folgenden Tag konnte die Präparation mit Hilfe des EndoFree® Plasmid Maxi Kits (Qiagen, Hilden) entsprechend den Angaben des Herstellerprotokolls (EndoFree® Plasmid Purification Handbook 11/2005) durchgeführt werden. Das Lösen der Plasmid-DNA erfolgte mit 200 µl H₂O.

2.4.16 DNA-Aufreinigung

Zur Aufreinigung der DNA nach enzymatischen Reaktionen wurden Ionenaustauscher-Säulen verwendet.

Die DNA-Aufreinigung wurde mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden) entsprechend den Angaben des Herstellerprotokolls (QIAquick Spin Handbook 07/2002) durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 30 µl H₂O.

2.4.17 DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung einiger Sequenzen wurden diese nach der Klonierung in die jeweiligen Vektoren sequenziert.

Die Sequenzierungen wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software VectorNTI (Invitrogen, Karlsruhe).

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung der Antikörper-Konjugate

Für den Transport des Tumorantigens zu den dendritischen Zellen *in vivo* war die chemische Kopplung des Tumorantigens an Antikörper, die gegen den murinen Rezeptor DEC205 (anti-DEC205) gerichtet sind, notwendig. Dieser Rezeptor ist nahezu exklusiv auf den dendritischen Zellen zu finden. Die bereits etablierte Methode zur chemischen Kopplung der Tumorantigene an anti-DEC205 setzt voraus, dass die vorhandenen SH-Gruppen des zu koppelnden Proteins in Disulfidbrücken eingebunden sind oder anderweitig für einen Reaktionspartner kaum zugänglich sind. Daher ist ein Reagieren des Crosslinkers mit den SH-Gruppen des Proteins nahezu unmöglich und eine selektive Bindung des Crosslinkers über seinen NHS-Ester mit frei zugänglichen Aminen des Proteins ist viel wahrscheinlicher. Bisher wurde der hetero-bifunktionelle Crosslinker Sulfo-SMCC direkt zum Protein zugegeben, um in einem ersten Schritt über seinen NHS-Ester mit einem Amin des Proteins zu reagieren. Das Maleimid des Crosslinkers reagierte dann in einem zweiten Schritt mit einer SH-Gruppe des partiell reduzierten Antikörpers. Da das zu koppelnde Protein „Large T Antigen“ (Tag) als Kernprotein keine posttranskriptionelle Modifikation durchläuft und seine SH-Gruppen in reduziertem Zustand vorliegen, kam es nach Zugabe des Crosslinkers zu sofortigem Ausfallen des Proteins. Aufgrund des gleichzeitigen Vorhandenseins zahlreicher Amine und reaktiver SH-Gruppen im Tag-Protein konnte der Crosslinker über beide reaktive Gruppen mit dem Protein reagieren und große, unlösliche Proteinkomplexe bilden. In den im Folgenden beschriebenen experimentellen Ansätzen wurde versucht diese Verklumpung der Proteine untereinander zu umgehen. Dabei sollte zum einen eine eins-zu-eins-Kopplung ermöglicht werden, d.h. ein gekoppeltes Protein pro Antikörper. Zum anderen sollte der Verlust des eingesetzten Proteins möglichst gering gehalten werden, da dieses im Falle des Tag-Proteins nur in begrenzter Menge zur Verfügung stand.

3.1.1 Verwendung des Crosslinkers MPBH

Für die Verwendung des Crosslinkers MPBH („4(4-N-maleimidophenyl)butyric acid hydracide*HCl*1/2 dioxane“) sprach die Möglichkeit, das Protein über seine SH-Gruppen gezielt an die sich am Fc-Teil des Antikörpers befindlichen Glykosilierungen koppeln zu können. Ein Koppeln des Proteins an den Fc-Teil des Antikörpers würde die variablen Bindungsregionen des Antikörpers nicht beeinträchtigen. Der Crosslinker sollte über seine Hydrazidgruppe an die zuvor oxidierten Glykosilierungsketten des Antikörpers gekoppelt werden. In der zweiten Reaktion sollte der so Maleimid-aktivierte Antikörper das Protein über dessen SH-Gruppen binden (Abb. 5).

1.: Oxidation der Glykosilierung zum Aldehyd

2.: Kopplung Hydrazid \longleftrightarrow Antikörper (A)

3.: Kopplung Maleimid \longleftrightarrow Protein (P)

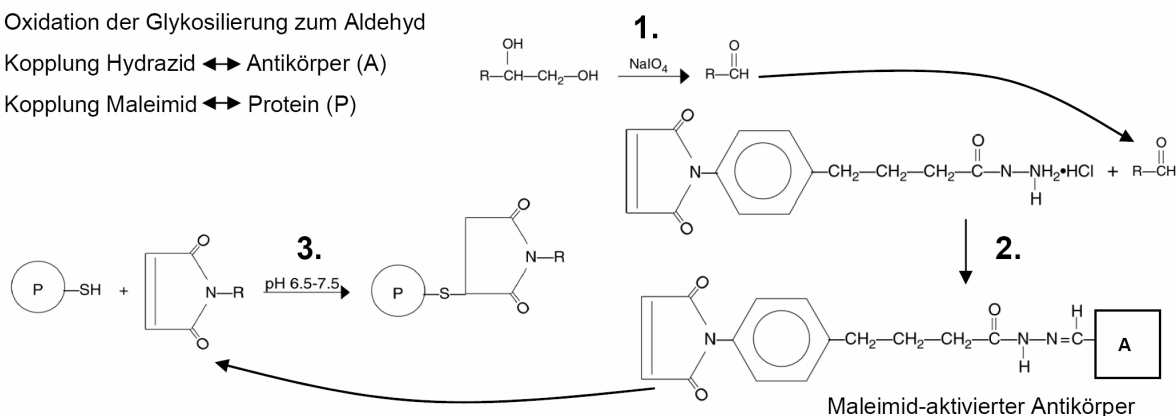


Abbildung 5: Schema der Kopplungsreaktion unter Verwendung des Crosslinkers MPBH.

Die erste Reaktion zeigt die Oxidation der Glykosilierung des Antikörpers (R = Rest, hier der Antikörper mit seiner Glykosilierung). Die zweite Reaktion zeigt das Binden des Crosslinkers an den Antikörper (A). Es entsteht der Maleimid-aktivierte Antikörper. In der dritten Reaktion wird das Protein (P) an den Maleimid-aktivierten Antikörper gekoppelt.

Die Zwischenprodukte der Kopplungsreaktion und das mutmaßliche Kopplungsprodukt wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit einer Silberfärbung sichtbar gemacht. Hier zeigte sich jedoch, dass auch nach Variation mehrerer Parameter wie der Menge des zugegebenen Oxidationsmittels Natrium-meta-Periodat ($NaIO_4$) und der Inkubationstemperatur kein erkennbares Kopplungsprodukt hergestellt werden konnte, sodass von dieser Methode abgesehen wurde.

3.1.2 Blockieren der Sulfhydryl-Gruppen mit N-Ethylmaleimid

Bei der bisher angewandten Kopplungsmethode reagierte der Crosslinker Sulfo-SMCC („Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate“) zuerst über seinen NHS-Ester mit einem primären Amin des Proteins. In einer zweiten Reaktion reagierte das Maleimid des gebundenen Crosslinkers mit dem Antikörper, der zuvor durch eine partielle Reduktion der Disulfidbrücken, die die schweren Ketten verbinden, geteilt wurde. Bei den beiden so entstandenen „single chains“ liegen die SH-Gruppen dann in reduzierter Form vor und können mit dem Maleimid eine kovalente Bindung eingehen. Der Vorteil dieser Methode lag darin, dass das Protein am Fc-Teil des Antikörpers gekoppelt wurde und somit die variable Region unbeeinflusst blieb. Darüber hinaus kam es dabei primär zu „eins-zu-eins-Kopplungen“ zwischen Protein und Antikörper. Aufgrund dieser Vorteile sollte diese Methode auch weiterhin angewandt werden.

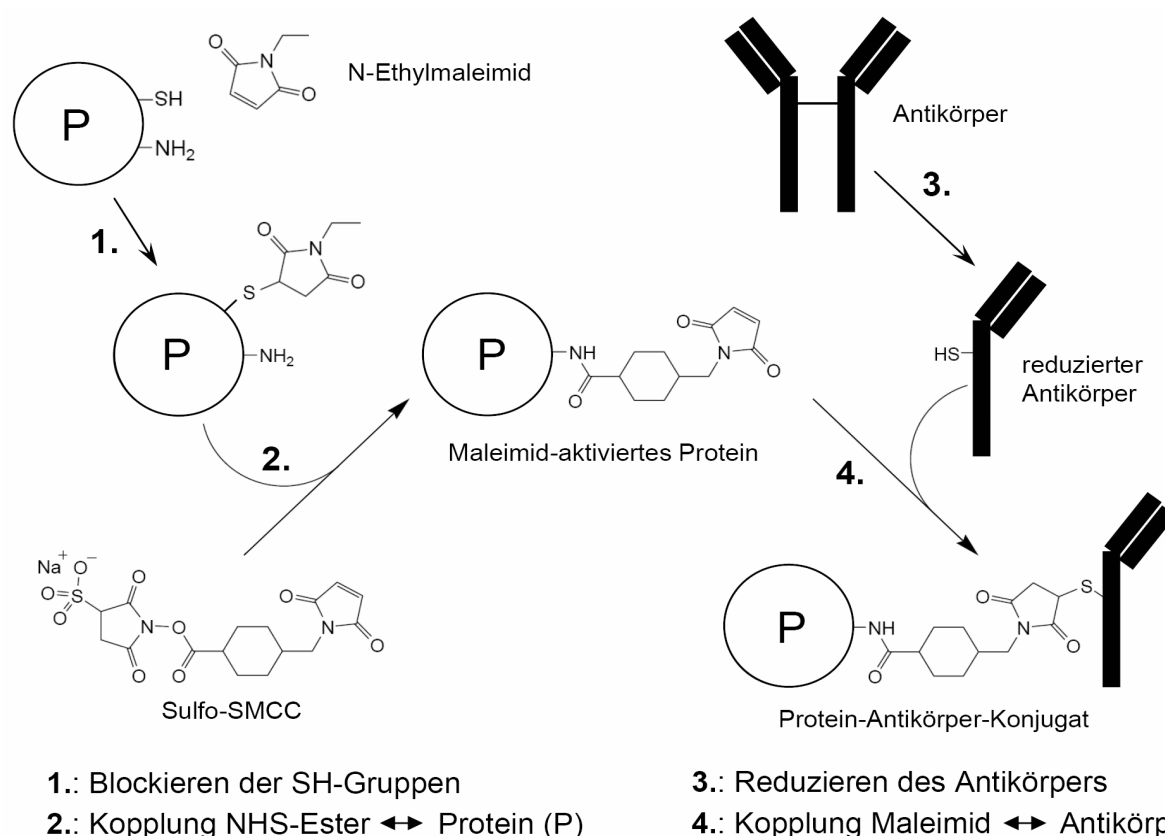


Abbildung 6: Schema der Kopplungsreaktion unter Verwendung des Crosslinkers Sulfo-SMCC und vorherigem Blockieren der SH-Gruppen.

In der ersten Reaktion wird die SH-Gruppe mit N-Ethylmaleimid blockiert (1.). Anschließend (2.) wird der Crosslinker selektiv an das primäre Amin des Proteins (P) gebunden. Parallel (3.) wird der Antikörper reduziert. In der vierten Reaktion wird das Maleimid-aktivierte Protein an den reduzierten Antikörper gekoppelt.

Bei den zu koppelnden Proteinen Large T Antigen (Tag) und der beta-Galactosidase (beta-Gal) liegen reduzierte, reaktive SH-Gruppen vor, daher bindet der Crosslinker nicht nur die primären Amine sondern gleichzeitig auch die SH-Gruppen des Proteins. Das führt zur Bildung von großen, unlöslichen Proteinkomplexen. Um dies zu verhindern, wurden im folgenden Ansatz die SH-Gruppen des zu koppelnden Proteins mit N-Ethylmaleimid blockiert (1., Abb. 6), sodass der Crosslinker nur noch über seine NHS-Ester-Gruppe mit den primären Aminen des Proteins reagieren konnte.

Dafür musste das Protein zwei Reaktionen mit den dazugehörigen Aufreinigungen durchlaufen. Dies führte zu einem hohen Verlust von Protein (Abb. 7).

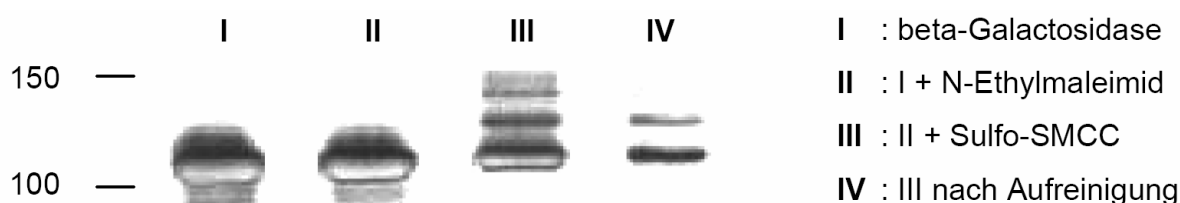


Abbildung 7: Proteinverlust während der Kopplungsreaktion.

Die Abbildung zeigt eine SDS-PAGE nach Protein-Silberfärbung von beta-Galactosidase vor der Reaktion (I), nach Zugabe des N-Ethylmaleimids (II), nach Zugabe des Crosslinkers (III) und nach dem Abtrennen des überschüssigen Crosslinkers (IV). Es wurden ausgehend von der Ausgangskonzentration gleiche Mengen aufgetragen (Größenangabe in kDa).

Das N-Ethylmaleimid wurde im Überschuss eingesetzt, um möglichst alle SH-Gruppen zu blockieren um so ein Binden des Crosslinkers an die SH-Gruppen zu verhindern. Da jedoch auch SH-Gruppen-haltige Cysteine teilweise in den Epitopen des Proteins vorkommen, die später über die MHC-Komplexe präsentiert werden sollten, kann durch die Bindung des N-Ethylmaleimids an ein solches Epitop eine Verschlechterung der Präsentation nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund des hohen Proteinverlustes und der möglicherweise schlechteren Antigenpräsentation wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

3.1.3 Verwendung des Crosslinkers Sulfo-SMCC

Auch im folgenden experimentellen Ansatz wurde der Crosslinker Sulfo-SMCC verwendet. In diesem Fall wurde die Kopplung jedoch so durchgeführt, dass der Crosslinker zuerst mit den primären Aminen des Antikörpers reagiert. Nach Abtrennen des überschüssigen Crosslinkers kann der Antikörper mit gebundenem

Crosslinker (Maleimid-aktivierter Crosslinker) direkt mit den SH-Gruppen des Proteins reagieren. Dies hat den Vorteil, dass das Protein ohne Vorbehandlung direkt zur Reaktion zugesetzt werden kann. Damit lässt sich der Verlust an Protein minimieren.

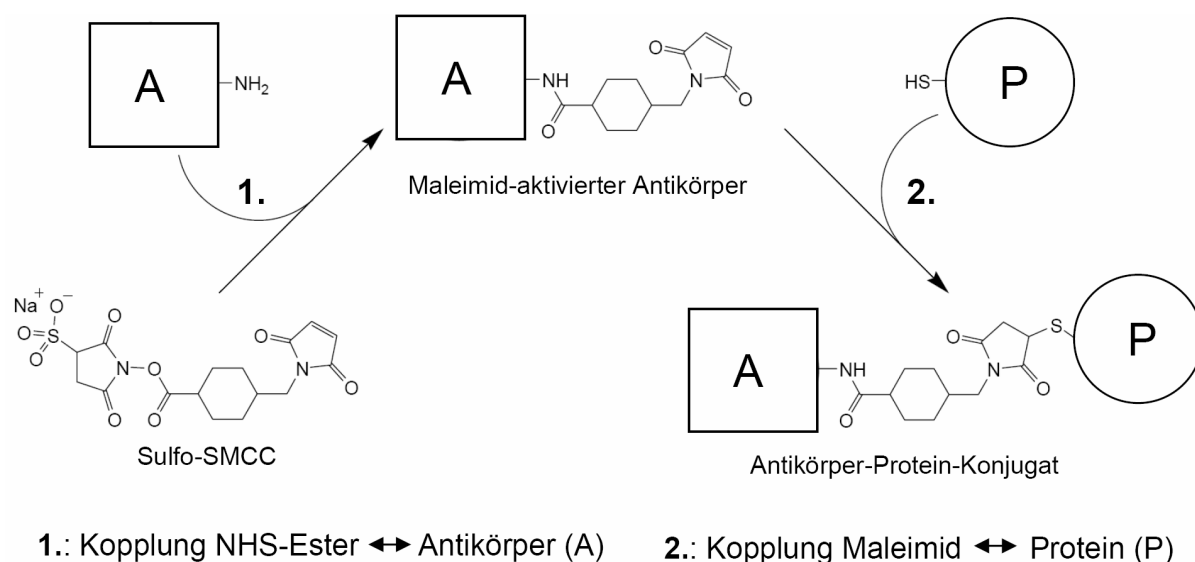


Abbildung 8: Schema der Kopplungsreaktion unter Verwendung des Crosslinkers Sulfo-SMCC.

In der ersten Reaktion bindet der Crosslinker an ein primäres Amin des Antikörpers (A). Anschließend (2.) wird das Protein (P) über seine SH-Gruppe an den Maleimid-aktivierten Antikörper gekoppelt.

Wie im Schema (Abb. 8) vereinfacht dargestellt, verfügen Antikörper nicht nur über ein primäres Amin, sondern über mehrere. Diese befinden sich unter Umständen auch im Bereich der variablen Regionen. Folglich könnte die Bindungsfähigkeit des Antikörpers durch die Kopplung über Crosslinker eingeschränkt werden. Deshalb ist es wichtig, auch die Bindungsfähigkeit der Konjugate zu überprüfen (s. Kap. 3.1.4). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass sehr komplexe Antikörper-Protein-Strukturen entstehen, da zum einen auf dem Antikörper mehrere Amine vorhanden sind und zum anderen auf dem Protein mehrere SH-Gruppen.

3.1.3.1 Herstellung der Protein-Antikörper-Konjugate

Während und nach der chemischen Kopplung wurden mehrere Untersuchungen der Ausgangs-, Zwischen- und Endprodukte durchgeführt. Vor dem ersten Reaktionsschritt (1., Abb. 8) wurde die Reaktivität des NHS-Esters nach Lösen des Crosslinkers wie in Kapitel 2.1.4 beschrieben getestet. Des Weiteren wurde der

Ellmantest zur Überprüfung der Funktion der Reaktionspartner des zweiten Reaktionsschrittes (2., Abb. 8) etabliert.

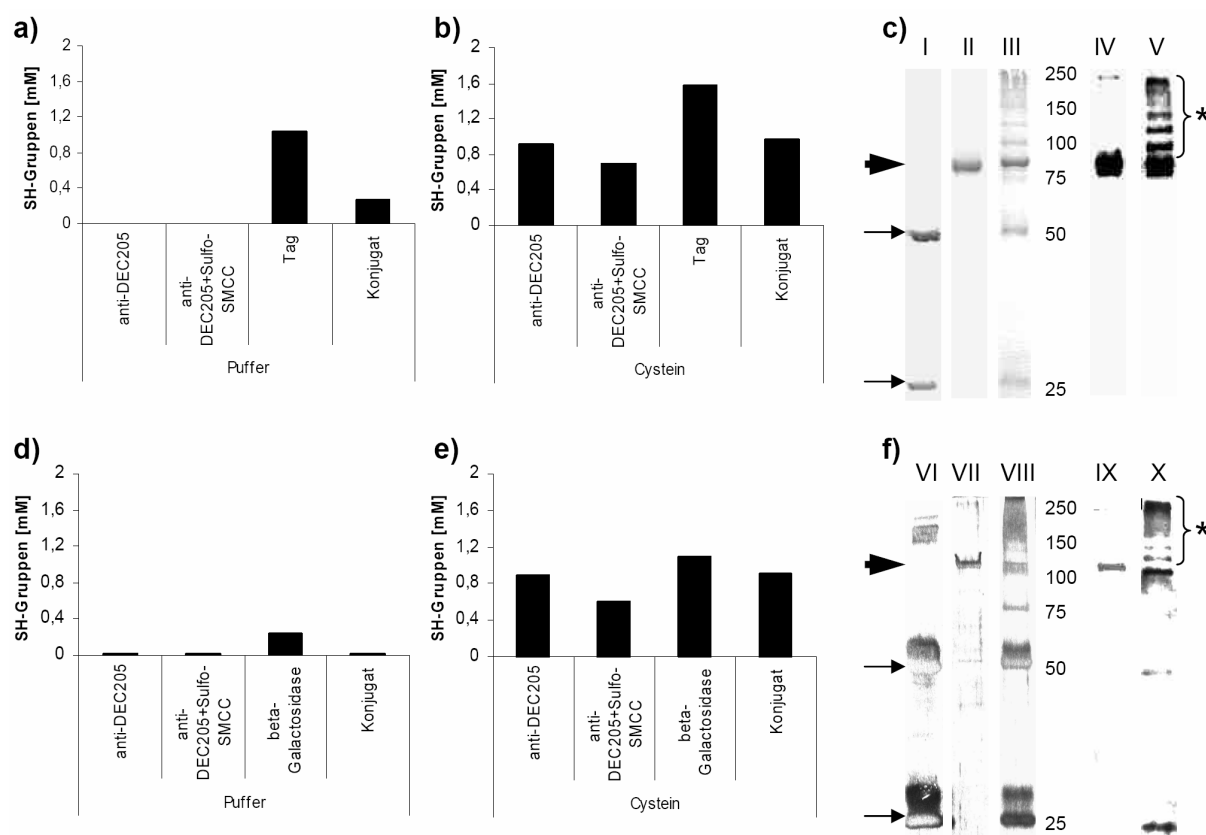


Abbildung 9: chemische Kopplung der Proteine an den Antikörper anti-DEC205.

In **a)**, **b)**, **d)** und **e)** werden die durch den Ellmantest ermittelten Mengen an SH-Gruppen der Reaktionspartner gezeigt. In **b)** und **e)** wurde vor dem Ellmantest Cystein zugegeben, um die Reaktivität des Maleimid-aktivierten Antikörpers zu testen. **c)** zeigt ein Coomassie-blau gefärbtes SDS-PAGE-Gel des Antikörpers (leichte (25 kDa) und schwere Kette (50 kDa), dünne Pfeile; I), des Tag-Proteins (dicker Pfeil, 82 kDa; II), des Konjugats (III) und einen anti-Tag Western-Blot des Tag-Proteins (IV) und des Konjugats (*; V). **f)** zeigt ein SDS-PAGE-Gel nach Proteinsilberfärbung des Antikörpers (leichte (25 kDa) und schwere Kette (50 kDa), dünne Pfeile; VI), des beta-Gal-Proteins (dicker Pfeil, 116 kDa; VII), des Konjugats (VIII) und einen anti-beta-Gal Western-Blot des beta-Gal-Proteins (IX) und des Konjugats (*; X). Die Größenangaben sind in kDa.

Die Ellmanreagenz oder auch DTNB (5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)) dient zur Quantifizierung von freien SH-Gruppen in Proteinen, die sich in Lösung befinden. Nach Zugabe der Ellmanreagenz reagiert diese mit SH-Gruppen und bildet Disulfidbrücken aus, wobei TNB (2-nitro-5-thiobenzoessäure) entsteht. Der durch frei werdendes TNB entstandene Farbumschlag lässt sich photometrisch bei 412 nm messen und ist gegen eine Cystein-Standardkurve quantifizierbar. Durch die Anwendung des Ellmantests konnte überprüft werden, ob das Protein SH-Gruppen in

reduzierter Form aufweist, bzw. ob der Antikörper frei von reaktiven SH-Gruppen ist. Sowohl bei Tag (Abb. 9a) als auch bei beta-Gal (Abb. 9d) ließen sich reduzierte SH-Gruppen nachweisen, während der Antikörper und der Maleimid-aktivierte Antikörper keine Reaktivität zeigten. Die Reaktivität des Konjugats (Abb. 9a) ist darauf zurückzuführen, dass mehr SH-Gruppen vorhanden waren, als vom Crosslinker gebunden werden konnten.

Zusätzlich wurden die gleichen Proben parallel nach Zugabe von 1 mM Cystein gemessen. Dies diente zur Ermittlung der Menge des gebundenen Crosslinkers bzw. der Reaktivität des Maleimids des Antikörper-gebundenen Crosslinkers. Der überschüssige, nicht gebundene Crosslinker wurde vor der Messung abgetrennt. Das reaktive Maleimid bindet einen Teil des zugegebenen Cysteins, sodass dieses für den anschließenden Ellmantest nicht mehr als Reaktionspartner zur Verfügung steht. Während der nicht-aktivierte Antikörper den Ausgangswert von ca. 1 mM zeigt (anti-DEC205, Abb. 9b und e), weisen die Maleimid-aktivierten Antikörper (anti-DEC205+Sulfo-SMCC, Abb. 9b und e) einen reduzierten Wert zwischen 0,6 und 0,8 mM auf und zeigen somit eine gute Reaktivität für die anschließende Kopplung des Proteins. Der erhöhte Wert der Proteine (Tag, Abb. 9b, beta-Gal, Abb. 9e) resultiert aus der Addition der Protein-eigenen SH-Gruppen und der SH-Gruppen des zugegebenen Cysteins.

Das SDS-PAGE-Gel des anti-DEC205-Tag-Konjugats (III; Abb. 9c) zeigt mehrere Banden oberhalb der ursprünglichen Proteinbande (82 kDa), die auf die Kopplung des Proteins an eine leichte oder schwere Ketten des Antikörpers, aber auch auf komplexe Antikörper-Protein-Gebilde (>150 kDa) hindeuten. Diese Bandenstruktur findet sich auch im Tag-Protein-spezifischen Western-Blot wieder (IV/V; Abb. 9c). Das anti-DEC205-beta-Gal-Konjugat zeigt ähnliche Strukturen im SDS-PAGE-Gel (VI-VIII; Abb. 9f) und im beta-Gal-spezifischen Western-Blot (IX/X; Abb. 9f).

3.1.3.2 Herstellung der Peptid-Antikörper-Konjugate

Im Mausstamm C57Bl/6 ist das von MHC I (H-2^b) präsentierte Epitop des „Large T Antigens“ (Tag-Protein), das TagIV-Epitop (TagIV₍₄₀₄₋₄₁₁₎: VVYDFLKC) bekannt. Darüber hinaus ist bekannt, dass der Austausch der letzten Aminosäure Cystein (C) durch ein Leucin (L) zu einer verbesserten Bindung des Epitops an das MHC-Molekül und somit zu einer besseren Präsentation bzw. Immunogenität des Peptids führt (-> TagIV₍₄₀₄₋₄₁₁₎; C->L): VVYDFLKL).¹³² Für die bereits etablierte Kopplungs-

methode (Kap. 2.1.3.3) ist eine SH-Gruppe eines Cysteins notwendig, um ein Protein oder Peptid an den Maleimid-aktivierten Antikörper koppeln zu können. Da nach Austausch des Cysteins im Peptid TagIV_(404-411; C->L) kein Cystein mehr vorhanden war wurden zusätzlich verlängerte Versionen der Peptide zur Kopplung eingesetzt. Die Peptidvarianten wurden N-terminal bis zum nächsten im Protein vorkommenden Cystein verlängert (TagIV₍₃₉₆₋₄₁₁₎: CLLPKMDSVVYDFLKC; TagIV_(396-411; C->L): CLLPKMDSVVYDFLKL).

Die Cystein-haltigen Peptide TagIV₍₄₀₄₋₄₁₁₎, TagIV₍₃₉₆₋₄₁₁₎ und TagIV_(396-411; C->L) wurden jeweils an den Antikörper anti-DEC205, wie in Kap. 2.1.3.3 beschrieben, chemisch gekoppelt. Abbildung 10 zeigt das Ergebnis der Kopplung des Peptids TagIV₍₃₉₆₋₄₁₁₎ an den Antikörper anti-DEC205. Die Kopplungen der beiden anderen Peptide zeigten vergleichbare Ergebnisse.

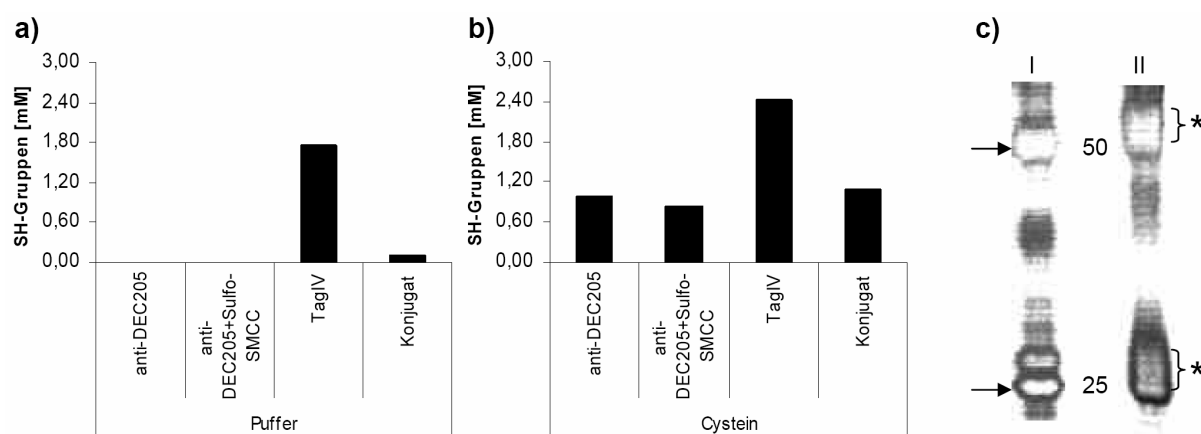


Abbildung 10: chemische Kopplung der Peptide an den Antikörper anti-DEC205.

In **a)** und **b)** werden die durch den Ellmantest ermittelten Mengen an SH-Gruppen der Reaktionspartner gezeigt. In **b)** wurde vor dem Ellmantest Cystein zugegeben, um die Reaktivität des Maleimid-aktivierten Antikörpers zu testen. **c)** zeigt ein SDS-PAGE-Gel nach Proteinsilberfärbung des Antikörpers (leichte (25 kDa) und schwere Kette (50 kDa), Pfeile; I) und des TagIV-Peptid-Konjugats (*; II).

Wie in Kapitel 3.1.3.1 bereits näher beschrieben wurde auch hier der Ellmantest zur Analyse der Reaktivität der einzelnen Reaktionspartner des zweiten Reaktionsschrittes (Abb. 8) durchgeführt. Das TagIV-Peptid zeigt eine sehr gute Reaktivität seiner SH-Gruppen (Abb. 10a). Beim nicht-aktivierte Antikörper ist das zugegebene Cystein vollständig wiederzufinden (ca. 1 mM, anti-DEC205, Abb. 10b), während der Maleimid-aktivierte Antikörper (anti-DEC205+Sulfo-SMCC, Abb. 10b) einen reduzierten Wert von rund 0,8 mM aufweist und somit eine gute Reaktivität für die anschließende Kopplung des Peptids zeigt. Der erhöhte Wert des Peptids (TagIV,

Abb. 10b) resultiert aus der Addition der Peptid-eigenen SH-Gruppen und der SH-Gruppen des zugegebenen Cysteins.

Das SDS-PAGE-Gel zeigt die leichte (25 kDa) und schwere Kette (50 kDa) des Antikörpers (I, Abb. 10c) und das Konjugat (II, Abb. 10c). Beim Konjugat ist eine Verbreiterung der Banden der leichten und der schweren Kette des Antikörpers nach oben um mehrere tausend Dalton erkennbar, was den Schluss zulässt, dass sowohl an die schweren wie auch an die leichten Ketten des Antikörpers mehrere Peptide (~2 kDa) gekoppelt wurden.

3.1.4 Bindung der Konjugate

Wie schon in Kapitel 3.1.3 erwähnt besteht prinzipiell die Möglichkeit, dass durch die relativ unspezifische Kopplung des Proteins an den Antikörper die variablen Regionen des Antikörpers ihre Fähigkeit verlieren, Antigen zu binden. Deshalb wurden verschiedene Bindungsstudien mit den Konjugaten durchgeführt, um zu untersuchen, inwieweit die neuen Konjugate an DEC205-exprimierende DCs binden können.

3.1.4.1 Bindung der Konjugate *in vitro*

Zu Beginn wurden die hergestellten Konjugate auf ihre Fähigkeit, an Lymphknotenzellen zu binden, hin untersucht. Dazu wurden isolierte Lymphknotenzellen mit anti-DEC205-Antikörper bzw. mit den Konjugaten inkubiert und im Anschluss mit FITC-markierten Sekundärantikörpern gefärbt. Des Weiteren wurden die Zellen mit einem PE-markierten anti-CD11c-Antikörper gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Wurde nun auf die CD11c-positive Population „gated“, zeigte sich eine vergleichbare Bindung des Protein-Konjugats und des ungekoppelten Antikörpers. 61% der CD11c-positiven Zellen sind DEC205-positiv (Abb. 11a). Und mit 62% positiven Zellen für das Protein-Konjugat zeigt dieses eine ebenso gute Bindung (Abb. 11b). Mit dem Peptid-Konjugat hingegen wurden nur 37% der Zellen angefärbt (Abb. 11c). Diese verminderte Bindung könnte dadurch erklärt werden, dass, wie in Kapitel 3.1.3.2 gezeigt, mehrere Peptide an einen Antikörper gekoppelt sind. Dadurch könnte das Bindungsverhalten des Peptid-Konjugats beeinträchtigt sein, wenn Peptide auch nahe der Bindungsregion gekoppelt worden sind. Andererseits kann aber auch die dreidimensionale Struktur

des Antikörpers durch das „Crosslinken“ so sehr verändert sein, dass der Sekundärantikörper das anti-DEC205-Peptid-Konjugat nicht mehr so stark bindet.

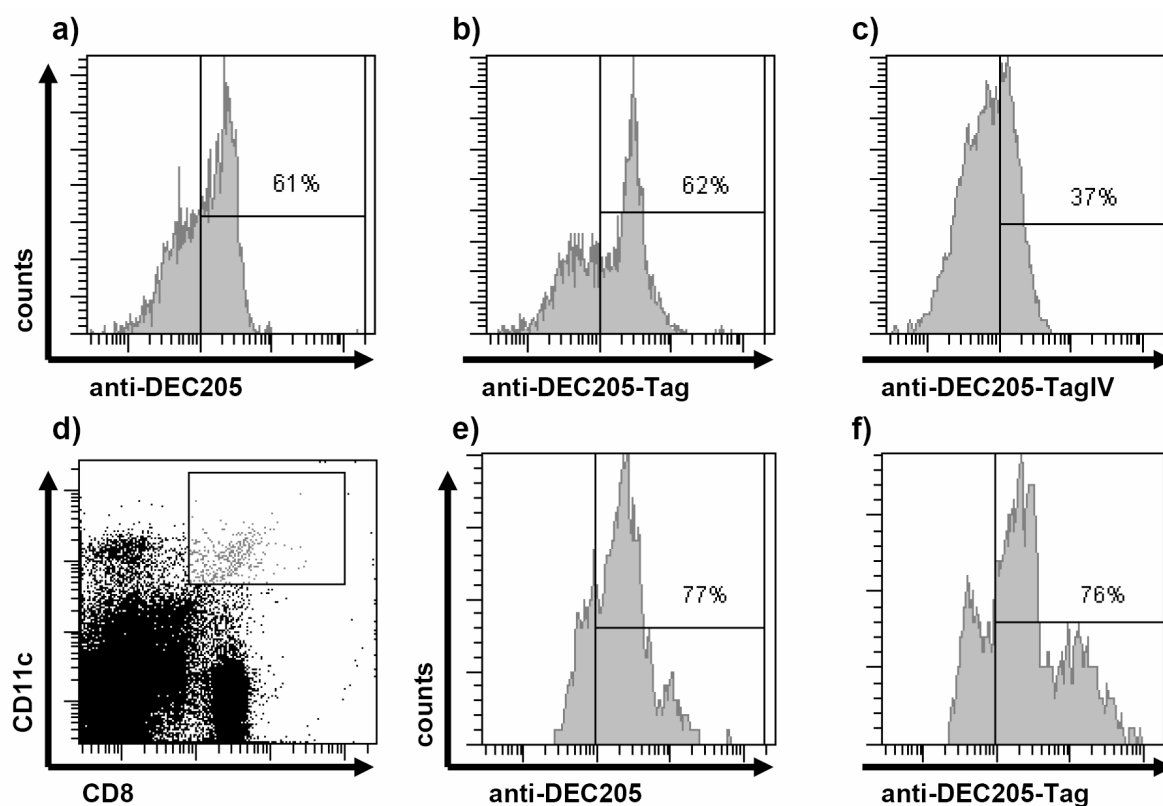


Abbildung 11: Bindung der Konjugate auf dendritischen Zellen.

FACS-Färbungen von CD11c-positiven Lymphknotenzellen (a-c). Vergleich der Bindung des Protein-Konjugats (b) und des Peptid-Konjugats (c) mit dem ungekoppelten Antikörper (a). FACS-Färbungen von Milzzellen (d-f), jeweils CD11c^{high}/CD8⁺ (e und f). Vergleich der Bindung des Protein-Konjugats (e) mit dem ungekoppelten Antikörper (f). Die Antikörper bzw. Konjugate wurden mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper gefärbt.

Im Weiteren wurden für die Bindungsversuche Milzzellen verwendet, die zusätzlich zu CD11c noch für CD8 gefärbt wurden. Es ist bekannt, dass unter den CD11c- und CD8-doppelt positiven Zellen (CD11c^{high}/CD8⁺) besonders viele DEC205-exprimierende dendritische Zellen sind⁹² und sich diese Subpopulation deshalb besonders gut für Bindungsstudien eignet. Diese Subpopulation ist in Abbildung 11d) gezeigt. 77% dieser Zellen sind DEC205-positiv (Abb. 11e). Wie schon mit den Lymphknotenzellen gezeigt werden konnte, bindet auch hier das Protein-Konjugat an die CD11c^{high}/CD8⁺ Milzzellen mit vergleichbaren Ergebnissen, wie sie mit den ungekoppelten Antikörpern erzielt werden (76%, Abb. 11f).

3.1.4.2 Bindung der Konjugate auf Lymphknotenschnitten

Zusätzlich zu den FACS-Färbungen wurden auch Lymphknotenschnitte mit DEC205-Antikörpern und den Konjugaten gefärbt, um das Bindungsverhalten der Konjugate an dendritische Zellen in situ mit dem der ungekoppelten Antikörper zu vergleichen. Auf Gefrierschnitten der Lymphknoten zeigt sich im Vergleich mit dem Protein-Konjugat (Abb. 12b) eine etwas intensivere Färbung, wenn der ungekoppelte Antikörper eingesetzt wird (Abb. 12a). Bei der Färbung mit Peptid-Konjugat (Abb. 12c) sind zwar ähnlich viele Zellen positiv wie beim Protein-Konjugat, jedoch ist die Färbung etwas weniger intensiv, ähnlich den Ergebnissen, die mit den FACS-Färbungen erzielt wurden. Lymphknotenschnitte, die nur mit Sekundärantikörper behandelt wurden, zeigten keine Färbung.

Die Ergebnisse zeigen, dass die hergestellten anti-DEC205-Konjugate an dendritische Zellen in situ binden können.

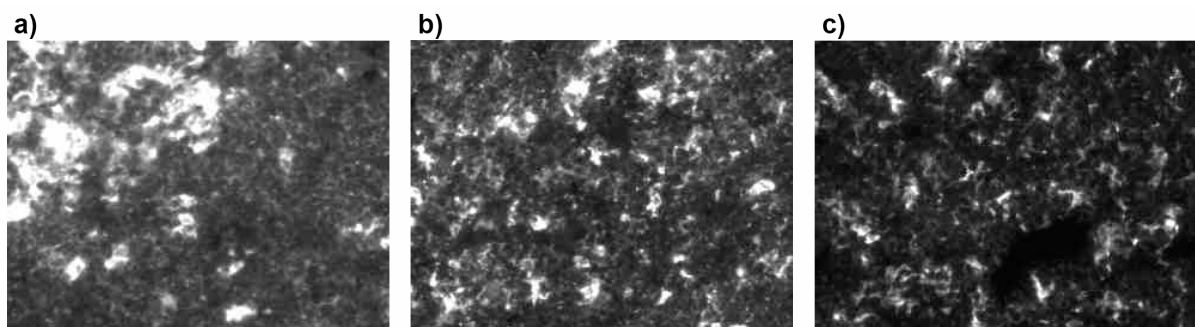


Abbildung 12: Bindung der Konjugate auf Lymphknotenschnitten.

Die Abbildung zeigt die Bindung des anti-DEC205-Antikörpers (a), des anti-DEC205-Tag-Konjugats (b) und des anti-DEC205-TagIV-Konjugats (c) auf Gefrierschnitten von Lymphknoten. Die gebundenen Antikörper bzw. Konjugate wurden mit FITC-markiertem Sekundärantikörper gefärbt und unter gleichen Bedingungen aufgenommen (20-fache Vergrößerung).

3.1.5 Immunogenität der Antikörper-Konjugate

Neben der spezifischen Bindung der Konjugate (Kap. 3.1.4) steht die Funktionalität im Vordergrund. Ziel war es mittels DC-gerichteter Immunisierung mit anti-DEC205-Konjugaten eine möglichst effektive und antigenspezifische Immunantwort auszulösen. Dies wurde in verschiedenen *in vivo* und *ex vivo*-Versuchen, wie im Folgenden gezeigt, getestet.

3.1.5.1 Induktion antigenspezifischer „Kill“-Aktivität *in vivo*

Mit dem sogenannten „*in vivo* kill assay“ ist es möglich eine Aussage über die Effektorfunktion von generierten CD8-positiven T-Zellen zu treffen. Im Speziellen wird hierbei die Fähigkeit Peptid-beladene Zielzellen abzutöten getestet.

Für die Durchführung des Assays wurden eine Woche nach der Immunisierung von Mäusen Milzzellen aus naiven Mäusen mit dem Peptid beladen, gegen das zuvor immunisiert wurde. Durch die anschließende Färbung der Zellen mit CFSE war es möglich, die Zellen nach Injektion und der Isolation nach 24 Stunden wieder zu identifizieren. Zusätzlich wurden als Referenz nicht beladene Zellen injiziert, die mit einer anderen CFSE-Konzentration gefärbt wurden. Dadurch ließen sich anschließend die zwei unterschiedlich stark CFSE-positiven Populationen im Durchflusszytometer getrennt nachweisen. Die prozentuale Abnahme der Peptid-gepulsten gegenüber den nicht-beladenen Zellen lässt eine Aussage über die „Kill“-Aktivität der induzierten Effektorzellen und somit über die Effektivität der Immunisierung zu.

In einem experimentellen Ansatz wurde zusätzlich zum antigenspezifischen Peptid ein unspezifisches Kontrollpeptid eingesetzt (Abb. 13a). Zu Beginn wurde jeweils drei C57Bl/6-Mäusen einmalig 5 µg Tag-Protein (III) oder 5 µg anti-DEC205-Tag-Konjugat (IV), jeweils plus 50 µg CpG und 50 µg poly I:C s.c. injiziert. Als Kontrollen dienten unbehandelte (I) oder nur mit CpG und poly I:C behandelte Mäuse (II). Eine Woche nach der Immunisierung wurden den Mäusen drei unterschiedlich stark CFSE-gefärbte Milzzell-Populationen zu gleichen Teilen (jew. 1×10^7 Zellen) injiziert. Eine Population wurde nicht beladen (CFSE_{mittel}), eine wurde mit dem antigenspezifischen TagIV-Peptid (H-2K^b) beladen (CFSE_{hoch}) und eine Population wurde mit dem beta-Gal-Kontrollpeptid (H-2K^b) beladen (CFSE_{niedrig}), gegen das zuvor nicht immunisiert wurde. 24 Stunden nach der Injektion wurden die Lymphknoten- und die Milzzellen der Mäuse isoliert und die CFSE-positiven Zellen gemessen. Anschließend wurde die prozentuale Abnahme der Peptid-beladenen Zellen gegenüber den nicht-beladenen Zellen ermittelt. Dabei konnte eine deutliche Reduktion der TagIV-beladenen Zell-Population nach Tag-Protein- und nach anti-DEC205-Tag-Konjugat-Immunisierung festgestellt werden. In den Kontrollgruppen konnte keine Verminderung der Zellzahlen gegenüber den unbeladenen Zellen festgestellt werden (Abb.13a).

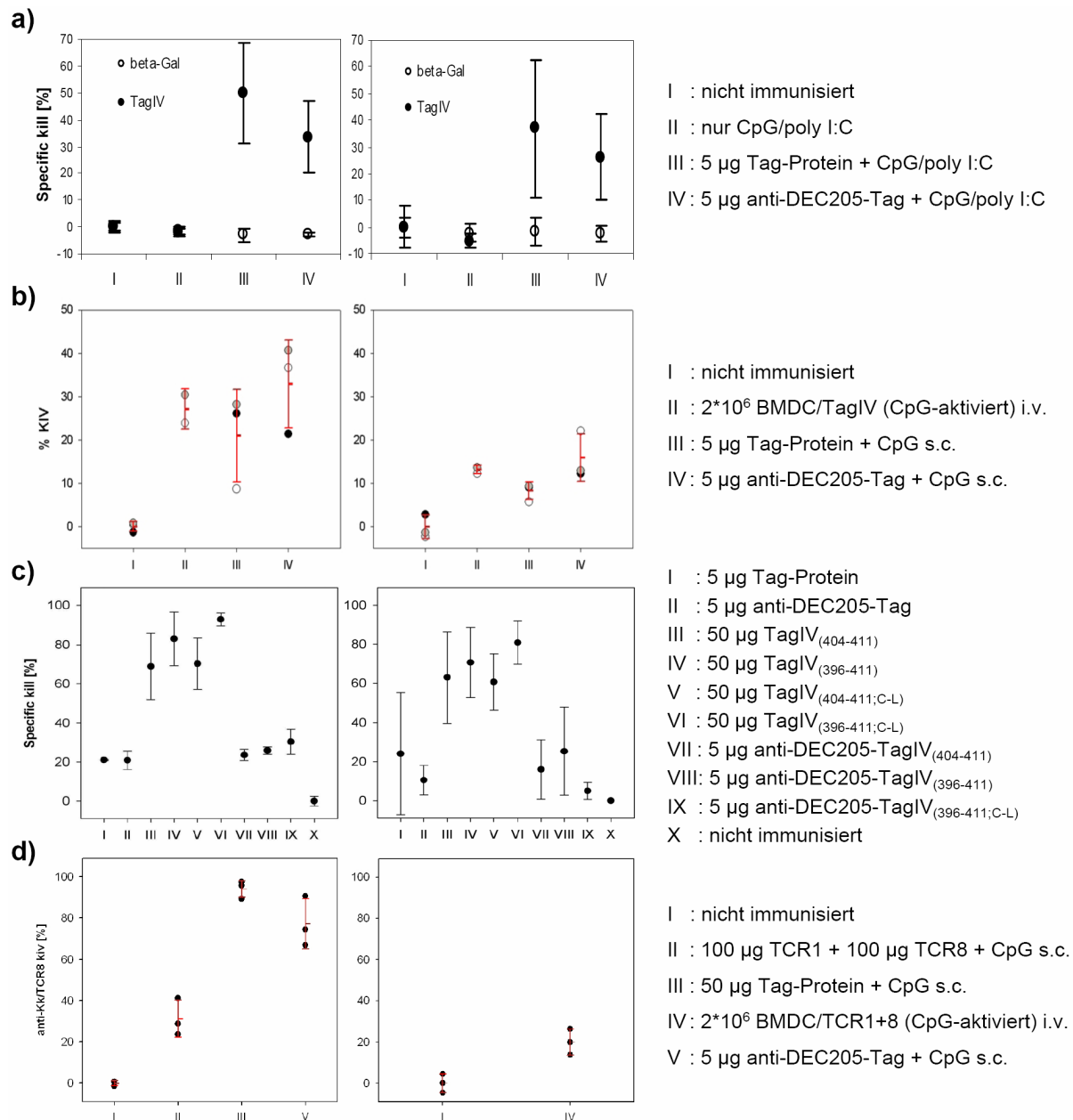


Abbildung 13: Induktion antigenspezifischer „Kill“-Aktivität *in vivo* mit verschiedenen Immunisierungsmethoden.

Den Mäusen wurden eine Woche nach der Immunisierung (wie angegeben) mit Peptid beladene und CFSE gefärbte Milzzellen injiziert. 24 Stunden nach der Injektion wurden die Zellen der drainierenden Lymphknoten und gegebenenfalls der Milz isoliert und auf ihre CFSE-Färbung im Durchflusszytometer untersucht. **a)** Vergleich der Protein-Konjugat-Immunisierung (IV) mit der Protein-Immunisierung (II) bei C57Bl/6-Mäusen. Als Kontrollen dienten nicht immunisierte (I) und nur mit CpG/poly I:C behandelte Mäuse (II). Die injizierten Milzzellen wurden mit dem antigenspezifischen TagIV (schwarzes Symbol) oder mit dem unspezifischen beta-Gal Peptid (offenes Symbol) beladen (links, Lymphknoten/rechts, Milz). **b)** Vergleich der Injektion von aktivierten BMDCs (II) mit der Protein-Konjugat-Immunisierung (IV) und der Protein-Immunisierung (III; alle C57Bl/6; links, Lymphknoten/rechts, Milz). **c)** Vergleich der Peptid- (VII-IX) und Protein-Konjugat-Immunisierung (II) mit der Peptid- (III-VI) und Protein-Immunisierung (I; alle C57Bl/6). Beladung der Zielzellen mit TagIV_(404-411;C-L) (links) oder TagIV₍₄₀₄₋₄₁₁₎ (rechts). **d)** Vergleich der Injektion von aktivierten BMDCs (IV) mit der Protein-Konjugat-Immunisierung (V) und der Peptid- (II) und Protein-Immunisierung (III) bei C3H-Mäusen.

Das Gleiche gilt für die Kontrollpeptid-Population in allen vier Gruppen. Somit konnte gezeigt werden, dass nach Tag-Protein und anti-DEC205-Tag-Konjugat-Behandlung eine Antigen-spezifische Immunantwort ausgelöst wurde, da weder nach der unspezifischen Aktivierung des Immunsystems mit CpG/poly I:C (II) noch nach Injektion von Kontrollpeptid-beladenen Zellen (beta-Gal), in den Lymphknoten (Abb. 13a, links) und in der Milz (Abb. 13a, rechts) eine Verminderung der Anzahl der Peptid-beladenen Zellen gegenüber der Kontrollpopulation festzustellen war.

In einem weiteren Versuch wurde die Protein- und die Konjugat-Immunisierung mit der Injektion antigenspezifisch aktivierter dendritischer Zellen (DCs) verglichen (Abb. 13b). Jeweils drei C57Bl/6-Mäusen wurden 5 µg Tag-Protein plus 50 µg CpG (III) oder 5 µg anti-DEC205-Tag-Konjugat plus 50 µg CpG (IV) injiziert oder blieben unbehandelt (I). Einer weiteren Gruppe wurden 2×10^6 TagIV-Peptid gepulste und CpG-aktivierte BMDCs („bone marrow derived dendritic cells“) i.v. injiziert (II). Eine Woche nach der jeweiligen Behandlung wurden den Mäusen TagIV-Peptid-beladene ($\text{CFSE}_{\text{hoch}}$) und nichtbeladene Milzzellen ($\text{CFSE}_{\text{niedrig}}$) aus naiven Mäusen injiziert und nach 24 Stunden aus den Lymphknoten und der Milz isoliert. Sowohl in den drainierenden Lymphknoten (Abb. 13b, links) als auch in der Milz (Abb. 13b, rechts) zeigen die Peptid-beladenen Zellen in allen drei behandelten Gruppen eine Verminderung der Zellzahlen, die vergleichbar mit den Ergebnissen ist, die mit nicht-beladenen Zellen erzielt wurden.

Des Weiteren wurden die Protein- und die Protein-Konjugat-Immunisierung mit der Peptid- und der Peptid-Konjugat-Immunisierung verglichen (Abb. 13c). Dafür wurden jeweils drei C57Bl/6-Mäuse mit 5 µg Tag-Protein (I), 5 µg anti-DEC205-Tag-Protein-Konjugat (II), 50 µg TagIV-Peptid (III-VI; vier verschiedene Varianten, siehe dazu Kap. 3.1.3.2), 5 µg anti-DEC205-TagIV-Peptid-Konjugat (VII-IX; drei verschiedene Varianten, siehe dazu Kap. 3.1.3.2), alle plus 50 µg CpG (I-IX) injiziert oder blieben unbehandelt (X). Nach einer Woche wurden den Mäusen jeweils 1×10^7 Milzzellen aus naiven Mäusen injiziert, die entweder mit TagIV₍₄₀₄₋₄₁₁₎-Peptid ($\text{CFSE}_{\text{niedrig}}$), mit TagIV_(404-411;C-L)-Peptid ($\text{CFSE}_{\text{hoch}}$) beladen oder nur mit CFSE gefärbt wurden (unbeladen; $\text{CFSE}_{\text{mittel}}$). Nach 24 Stunden wurden die Zellen aus den Lymphknoten isoliert und im Durchflusszytometer gemessen. Hierbei zeigte sich eine wesentlich stärkere Reduktion der Anzahl der Zielzellen nach Peptid-Immunisierung verglichen mit den Protein- und den Konjugat-Immunisierungen (Abb. 13c). Dabei wurden die

TagIV_(404-411;C-L)-Peptid-beladenen Populationen (Abb. 13c, links) stärker reduziert als die TagIV₍₄₀₄₋₄₁₁₎-Peptid-beladenen (Abb. 13c, rechts).

Zusätzlich zu den Versuchen mit C57Bl/6-Mäusen (Abb. 13a-c) wurde ein Versuch mit C3H-Mäusen durchgeführt (Abb. 13d). Dafür wurden jeweils drei C3H-Mäusen jeweils 100 µg TCR1-Peptid und TCR8-Peptid (TCR-CD8) (II), 50 µg Tag-Protein (III) oder 5 µg anti-DEC205-Tag-Konjugat (V), jeweils plus 50 µg CpG injiziert oder blieben unbehandelt (I). Einer weiteren Gruppe wurden 2×10^6 zuvor Peptid-gepulste (TCR1- und TCR8-Peptid) und CpG-aktivierte BMDCs injiziert. Eine Woche nach der jeweiligen Behandlung wurden den Mäusen TCR8-Peptid-beladene (CFSE_{hoch}) und nichtbeladene Milzzellen (CFSE_{niedrig}) aus naiven Mäusen injiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen aus den Lymphknoten (Abb. 13d, links) bzw. aus der Milz (Abb. 13d, rechts) isoliert und im Durchflusszytometer gemessen. Hier zeigen die Zielzellen der Protein- und der Protein-Konjugat-immunisierten Mäuse eine deutlichere Verminderung in ihrer Anzahl im Vergleich zu den Peptid-immunisierten Mäusen oder den Mäusen, die mit BMDC immunisiert wurden. Dabei ist anzumerken, dass, verglichen mit anti-DEC205-Tag-Konjugat, die zehnfache Menge an Tag-Protein zur Immunisierung eingesetzt wurde.

Abschließend kann gesagt werden, dass mit dem anti-DEC205-Tag-Konjugat eine mit den anderen Immunisierungsmethoden vergleichbare „Kill“-Aktivität induziert werden konnte. Die Peptid-Immunisierung der C57Bl/6-Mäuse brachte vergleichend mit den anderen Immunisierungsmethoden die stärkste „Kill“-Aktivität. Im C3H-Mausstamm hingegen zeigte das anti-DEC205-Tag-Konjugat gegenüber dem Peptid-Gemisch eine wesentlich bessere Wirkung, obwohl die 40-fache Menge an Peptid gegenüber dem Konjugat eingesetzt wurde.

3.1.5.2 Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort nach Immunisierung mit anti-DEC205-Konjugaten

Zur Ermittlung der Interferon-gamma- (IFN-gamma) Produktion nach Konjugat-Immunisierung wurde ein IFN-gamma-ELISPOT durchgeführt. Dabei kamen zwei unterschiedliche anti-DEC205-Konjugate zum Einsatz, um die Antigenspezifität der Konjugat-Immunisierung zu überprüfen.

Es wurde mit jeweils 5 µg anti-DEC205-Tag-Konjugat, 5 µg anti-DEC205-beta-Gal-Konjugat oder mit je 5 µg der unkonjugierten Proteine Tag oder beta-Gal immunisiert (alle plus 50 µg CpG und 50 µg poly I:C). Zur Kontrolle blieben die Mäuse

unbehandelt oder es wurde zur unspezifischen Aktivierung des Immunsystems nur CpG und poly I:C injiziert (Abb. 14). Nach einer Woche wurden die Milzzellen isoliert und entweder mit TagIV-Peptid plus IL-2 oder beta-Gal-Peptid plus IL-2 für 24 Stunden restimuliert. Zur Kontrolle wurde nur IL-2 zugegeben (neg).

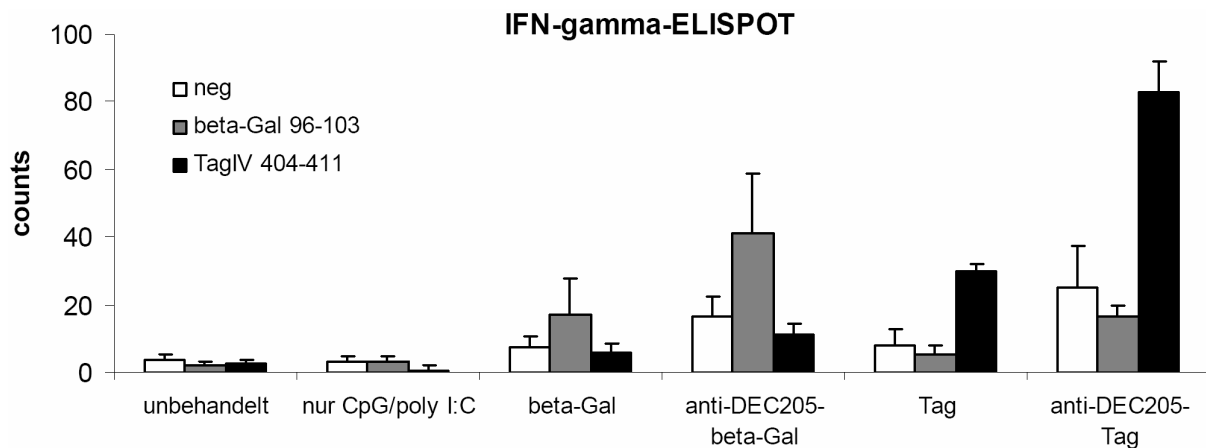


Abbildung 14: Antigen-spezifische Aktivierung der Effektorzellen nach Konjugat-Behandlung.

Eine Woche nach der Immunisierung mit beta-Gal-Protein, anti-DEC205-beta-Gal-Konjugat, Tag-Protein oder anti-DEC205-Tag-Konjugat wurden die Milzzellen isoliert und für 24 Stunden mit beta-Gal₍₉₆₋₁₀₃₎ plus IL-2 oder TagIV₍₄₀₄₋₄₁₁₎ plus IL-2 restimuliert (neg: nur Zugabe von IL-2). Unbehandelte oder nur mit CpG/poly I:C behandelte Mäuse dienten als Kontrolle. Angegeben ist die Anzahl der IFN-gamma-positiven T-Zellklone (jew. 1×10^6 Zellen; n=3) nach Restimulation wie angegeben.

Nach der Restimulation wurden die IFN-gamma-produzierenden T-Zellen in den Kulturen über IFN-gamma-Antikörper, einer Peroxidase und DAB-Substrat sichtbar gemacht und gezählt. Die Kontrollen zeigen keine erhöhte Anzahl an IFN-gamma-produzierenden T-Zellen (unbehandelt/nur CpG/poly I:C, Abb. 14). Nach beta-Gal-Immunisierung zeigt sich eine leicht erhöhte Anzahl an IFN-gamma-produzierenden T-Zellen, wenn diese mit beta-Gal-Peptid restimuliert wurden, verglichen mit der TagIV-Peptid-Restimulation oder den nicht restimulierten Zellen. Dies gilt auch nach anti-DEC205-beta-Gal-Immunisierung, wobei hier die Werte höher sind. Ähnlich ist es nach der Tag- bzw. anti-DEC205-Tag-Immunisierung. Jedoch sind hier, entsprechend der Immunisierung, die Anzahl der IFN-gamma-produzierenden T-Zellklone nach TagIV-Peptid-Restimulation, vor allem nach anti-DEC205-Tag-Immunisierung deutlich erhöht.

Hiermit konnte gezeigt werden, dass mit den Konjugaten das Immunsystem antigenspezifisch aktiviert wurde. Darüber hinaus induzierten beide Konjugate eine verbesserte Immunantwort, im Vergleich zu den jeweils unkonjugierten Proteinen.

3.1.5.3 Proliferation *in vivo* nach anti-DEC205-Tag-Behandlung

Im Mausstamm C3H sind sowohl das auf MHC I als auch das auf MHC II präsentierte Epitop des Tag-Proteins bekannt. Darüber hinaus sind T-Zellrezeptor-transgene Mäuse verfügbar, die mit ihrem transgenen T-Zellrezeptor (TCR) den Tag-Peptid-MHC I-Komplex (\Rightarrow TCR-CD8) oder den Tag-Peptid-MHC II-Komplex (\Rightarrow TCR1) erkennen. Mit Hilfe der TCR-transgenen Zellen dieser Tiere wurde in dem im Folgenden beschriebenen experimentellen Ansatz die Proliferation der CD4- und der CD8-positiven T-Zellen nach der Konjugat-Immunisierung bestimmt. Mit Hilfe einer CFSE-Färbung der Zellen lässt sich die Stärke der Proliferation bestimmen, da sich bei jeder Teilung die Menge an CFSE gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt und somit halbiert. Je geringer also die CFSE-Intensität ist, desto öfter haben sich die Zellen geteilt. Zusätzlich wurden die Zellen mittels einer intrazellulären FACS-Färbung für IFN-gamma gefärbt. Anhand der IFN-gamma-Expression kann eine Aussage über die Effektorfunktion der proliferierten Zellen gemacht werden.

Zu Beginn wurden die T-Zellen aus den T-Zellrezeptor-transgenen Mäusen isoliert und über magnetische Zellseparation aufgereinigt. Die CD4-Zellen wurden aus den TRC1-Mäusen isoliert, die CD8-Zellen aus den TCR-CD8-Mäusen. Dabei trugen ca. zehn Prozent der CD4-positiven Zellen und ca. 90 Prozent der CD8-positiven Zellen den transgenen T-Zellrezeptor. Die isolierten Zellen wurden nach der CFSE-Färbung in naive Mäuse i.v. injiziert, wobei jeweils 1×10^6 TCR-transgene Zellen pro Zelltyp und Maus injiziert wurden. Am darauf folgenden Tag wurden jeweils drei Mäuse mit 5 μ g oder 50 μ g Tag-Protein oder 5 μ g anti-DEC205-Tag-Konjugat, jeweils plus 50 μ g CpG, immunisiert. Als Positivkontrolle wurde eine Maus mit jeweils 100 μ g TCR1- und TCR-CD8-Peptid plus 50 μ g CpG immunisiert (Peptid-Mix). Eine nach dem T-Zell-Transfer nicht weiter behandelte Maus diente als Negativkontrolle. Nach weiteren 46 Stunden wurden die Zellen der drainierenden Lymphknoten (axial und brachial) isoliert, für IFN-gamma gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Dabei wurden die Proliferation und die IFN-gamma-Produktion der TCR-transgenen, CFSE-positiven CD4- bzw. CD8-positiven T-Zellen bestimmt. Während die CD4-positiven Zellen der unbehandelten Maus kaum proliferierten (14%), proliferierten fast

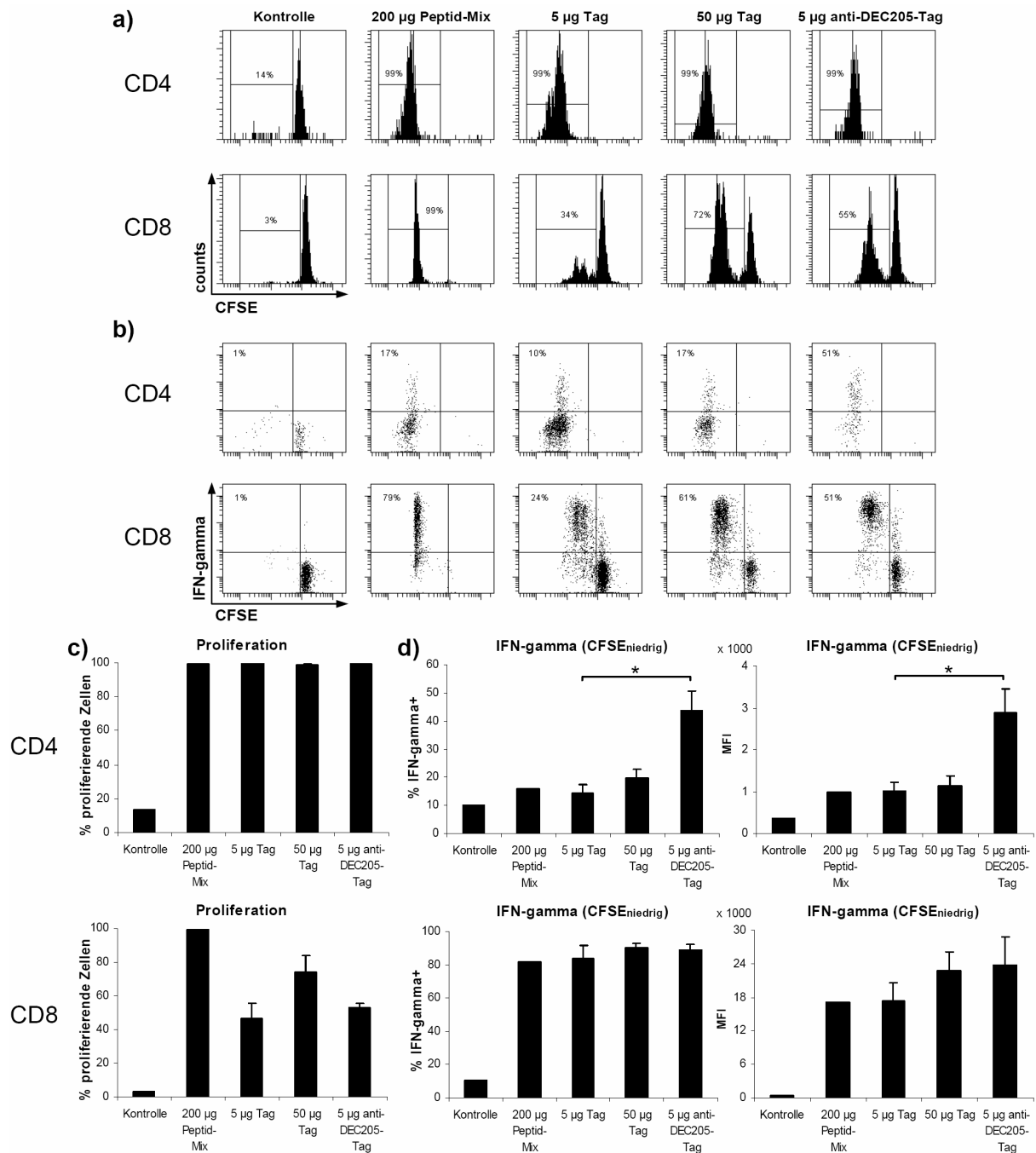


Abbildung 15: Antagenspezifische Proliferation und IFN-gamma-Produktion der T-Zellen nach DC-gerichteter Immunisierung.

Nach Transfer der CFSE-gefärbten, T-Zellrezeptor-transgenen CD4 (TCR1) und CD8-positiven (TCR-CD8) T-Zellen wurden die Mäuse mit 5 µg oder 50 µg Tag-Protein oder 5 µg anti-DEC205-Tag-Konjugat immunisiert. Als Negativkontrolle diente eine nicht immunisierte Maus nach T-Zelltransfer (Kontrolle). Als Positivkontrolle diente eine Maus, die nach T-Zelltransfer mit jeweils 100 µg TCR1- und TCR-CD8-Peptid immunisiert wurde (Peptid-Mix). **a)** Proliferation der TCR-transgenen, CFSE-positiven CD4- (oben) und CD8-T-Zellen (unten) nach Behandlung wie angegeben. **b)** IFN-gamma-Produktion und Proliferation der TCR-transgenen, CFSE-positiven T-Zellen (CD4, oben/CD8, unten). **c)** Proliferation der TCR-transgenen, CFSE-positiven T-Zellen (CD4, oben/CD8, unten; für Protein- und Konjugat-Immunisierte, n=3). **d)** IFN-gamma-Produktion der TCR-transgenen, proliferierenden/CFSE_{niedrig}-positiven T-Zellen (% IFN-gamma+, links und mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI), rechts; CD4, oben/CD8, unten; für Protein- und Konjugat-Immunisierte, n=3). **P*<0,05).

alle CD4-positiven Zellen der behandelten Mäuse (99%, Abb. 15a, oben). Bei den CD8-positiven Zellen zeigte die Kontrolle ebenfalls keine nennenswerte Proliferation (3%), während bei der Positivkontrolle nahezu alle Zellen proliferierten (99%, Abb. 15a, unten). Ungefähr drei Viertel der CD8-positiven Zellen der mit 50 µg Tag behandelten Mäuse proliferierten, während es bei den Mäusen, die mit 5 µg Tag und 5 µg anti-DEC205-Tag behandelt wurden, weniger waren. Die Ergebnisse der Proliferation der T-Zellen aller untersuchten Mäuse sind in Abbildung 15c) zusammengefasst (n=3 für 5 µg Tag, 50 µg Tag und 5 µg anti-DEC205-Tag).

Während nach Peptid- und Protein-Immunisierung weniger als ein Viertel der CD4-positiven Zellen IFN-gamma produzierten, waren es nach DC-gerichteter Immunisierung mit anti-DEC205-Tag rund die Hälfte (Abb. 15b, oben). Die Ergebnisse der IFN-gamma-Produktion der T-Zellen aller untersuchten Mäuse sind in Abbildung 15d) zusammengefasst (n=3 für 5 µg Tag, 50 µg Tag und 5 µg anti-DEC205-Tag). Hierbei sind zum einen die IFN-gamma-positiven, proliferierten T-Zellen in Prozent angegeben (% IFN-gamma+, links), zum anderen die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI, rechts).

In Abbildung 15b) (unten) und in der Zusammenfassung (Abb. 15d, unten) ist die IFN-gamma-Produktion der CD8-positiven Zellen gezeigt. Betrachtet man die proliferierten Zellen, so zeigen nahezu alle Zellen der behandelten Mäuse eine IFN-gamma-positive Färbung (Abb. 15d, unten links), wobei die CD8-positiven T-Zellen nach anti-DEC205-Tag-Immunisierung die höchste mittlere Fluoreszenz-Intensität aufweisen (Abb. 15d, unten rechts).

Die gemessene Proliferation der CD4- und der CD8-positiven T-Zellen ist nach der anti-DEC205-Tag-Immunisierung vergleichbar mit den Ergebnissen, die nach Immunisierung mit der gleichen Menge Tag-Protein erzielt wurden. Die DC-gerichtete Immunisierung mit anti-DEC205-Tag induziert jedoch eine höhere, im Fall der CD4-positiven T-Zellen eine sogar signifikant höhere IFN-gamma-Produktion gegenüber der Peptid- oder der Protein-Immunisierung, selbst wenn davon die zehnfache (50 µg Tag) oder 40-fache Menge (200 µg Peptid-Mix) verabreicht wurde.

3.2 Tumorexperimente

3.2.1 Transplantierbare Tumormodelle

In den Vakzinierungsuntersuchungen kamen verschiedene transplantierbare Tumoren zum Einsatz. Sie wurden alle subkutan appliziert, was die Beobachtung des Tumorwachstums ermöglichte. Mit der Behandlung der Tumoren wurde erst begonnen, nachdem sie deutlich sichtbar waren, um eine therapeutische Situation zu imitieren (s. Abb. 16). Das Fortschreiten des Tumorwachstums wurde alle zwei bis drei Tage mit einem Messschieber ermittelt und das Tumolvolumen mit der Formel „Tumolvolumen [mm³] = Länge x Breite² x 0,52“ berechnet. Nach Überschreiten eines Tumolvolumens von 600 mm³ wurden die Mäuse getötet. Die Daten wurden sowohl als Wachstumskurven als auch als Überlebenskurven analysiert.

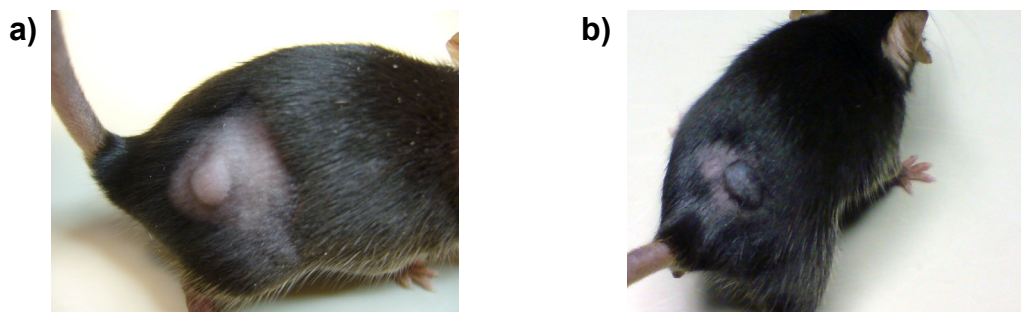


Abbildung 16: Tumorgöße zu Beginn der Behandlung.
a) RMA-Tag-Tumor. b) B16-Tag-Tumor.

3.2.1.1 Aktivierung der dendritischen Zellen

Für die im Folgenden beschriebenen Tumorexperimente wurden gemeinsam mit der Gabe des Tumorantigens die dendritischen Zellen aktiviert, um eine Immunantwort auszulösen und Toleranzausbildung, die durch unreife DCs gefördert wird, zu verhindern.

Die für die Aktivierung der dendritischen Zellen eingesetzten Substanzen CpG und poly I:C wurden in einer BMDC-Kultur („bone marrow derived dendritic cells“) *in vitro* getestet. Am Tag 6 einer BMDC-Kultur wurde dieser 50 µg/ml CpG und 50 µg/ml poly I:C zugegeben. Zum Zeitpunkt 0, also vor Zugabe der aktivierenden Substanzen, waren die BMDCs noch im unreifen Zustand, was sich durch die niedrige Expression

der Reifungsmarker CD80 (7% der CD11c⁺) und CD86 (10% der CD11c⁺, Abb. 17a) äußert. Bereits nach sechs Stunden verdoppelt sich die Anzahl der CD80- bzw. der CD86-positiven Zellen. Nach 24 Stunden sind 42% der Zellen CD80-positiv und 56% CD86-positiv. Die Zahl der MHC II-positiven Zellen innerhalb der CD11c-positiven Population nimmt zwar nicht so stark zu (von 58% auf 70%, Abb. 17a), aber es bildet sich bereits nach sechs Stunden eine stark MHC II-positive Population heraus, die sich nach 24 Stunden weiter von den schwach MHC II-positiven abhebt.

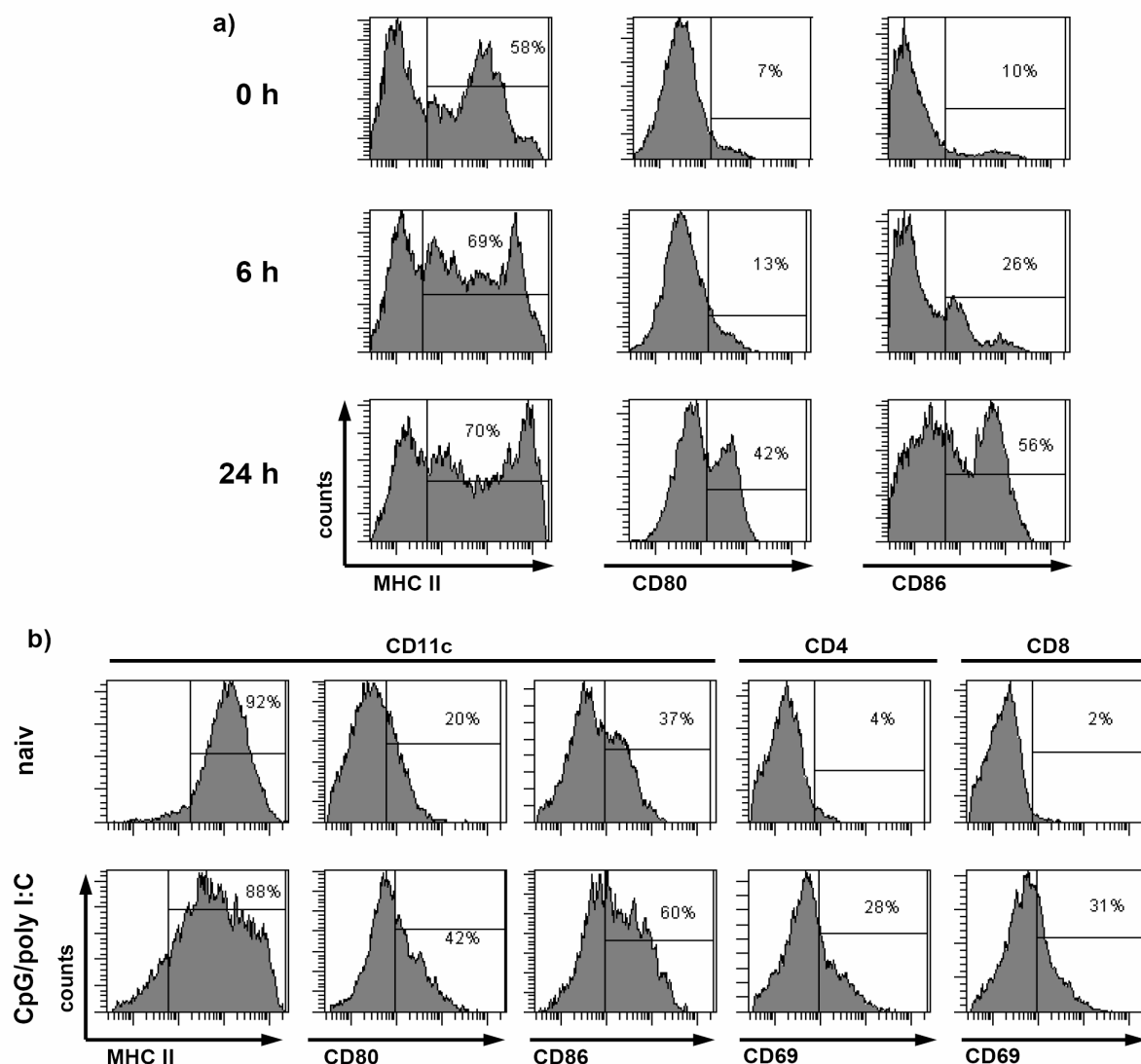


Abbildung 17: Aktivierung der dendritischen Zellen *in vitro* und *in vivo*.

a) Zu einer Knochenmarks-DC-Kultur (Tag 6) wurden jeweils 50 µg/ml CpG und poly I:C zugegeben (0h) und nach 6 und 24 Stunden die Reifung der CD11c-positiven Knochenmarks-DCs anhand der Oberflächenmoleküle MHC II, CD80 und CD86 untersucht. In **b)** wurden C57Bl/6-Mäuse mit CpG und poly I:C behandelt (jeweils 50 µg s.c.) oder blieben als Kontrolle unbehandelt (naiv). Die dendritischen Zellen und die T-Zellen der drainierenden Lymphknoten wurden anhand der Oberflächenmoleküle MHC II, CD80, CD86 bzw. CD69 auf ihre Reifung bzw. ihren Aktivierungszustand hin untersucht (n=3).

Darüber hinaus wurden die eingesetzten Substanzen CpG und poly I:C auch *in vivo* getestet. Dafür wurde, wie auch in den folgenden Tumorexperimenten, den Mäusen 50 µg CpG und 50 µg poly I:C subkutan injiziert. Nach fünf Tagen erfolgte eine weitere Injektion und nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen der drainierenden Lymphknoten analysiert. Als Kontrolle dienten naive Mäuse. Wie in Abbildung 17b zu sehen ist, nimmt die Anzahl der MHC II-positiven DCs nicht signifikant zu, jedoch ist im Histogramm eine Zunahme der mittleren Fluoreszenz-Intensität von MHC II-positiven Zellen erkennbar. Die Reifungsmarker CD80 und CD86 zeigen eine deutlich höhere Expression in den CpG/poly I:C-behandelten Mäusen, verglichen mit den naiven Mäusen. Zudem konnte eine deutliche Aktivierung der T-Zellen festgestellt werden, die sich durch die höhere Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf den CD4-positiven und den CD8-positiven Zellen zeigt (Abb. 17b). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Injektion von CpG/poly I:C in der Lage ist, dendritische Zellen und T-Zellen *in vivo* zu aktivieren.

3.2.1.2 Verzögerung des Wachstums von RMA-Tag-Tumoren nach Peptid-Konjugat-Behandlung

Basierend auf den Ergebnissen des „*in vivo* Kill“-Assays (Kap. 3.1.5.1) wurden das Peptid-Konjugat anti-DEC205-TagIV_(396-411; C->L) bzw. das Peptid TagIV_(396-411; C->L) initial zur Vakzinierung in Tumorversuchen eingesetzt. Beide, Peptid und Peptid-Konjugat, wurden mit jeweils 50 µg CpG und poly I:C subkutan injiziert. Als Kontrolle dienten nur mit 50 µg CpG und poly I:C behandelte Mäuse. Mit den Vakzinierungen wurde nach dem Sichtbarwerden der Tumoren begonnen. Nach drei aufeinander folgenden Behandlungen (Pfeile, Abb. 18d) wurde das Tumorwachstum weiter beobachtet.

Wie in Abbildung 18c zu sehen ist, verringert sich das Tumolvolumen während der Behandlung mit anti-DEC205-TagIV. Jedoch beginnen nach wenigen Tagen die Tumoren wieder zu wachsen. Nach der Vakzinierung mit Peptid ergibt sich eine nur kurzzeitige Verlangsamung des Tumorwachstums. Lediglich bei einer Maus zeigte sich eine deutlichere Verzögerung gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 18b). Trotz anfänglicher Verzögerung des Tumorwachstums ergab sich weder nach Peptid- noch nach Konjugat-Behandlung eine deutliche Verlängerung der Überlebensdauer (Abb. 18e).

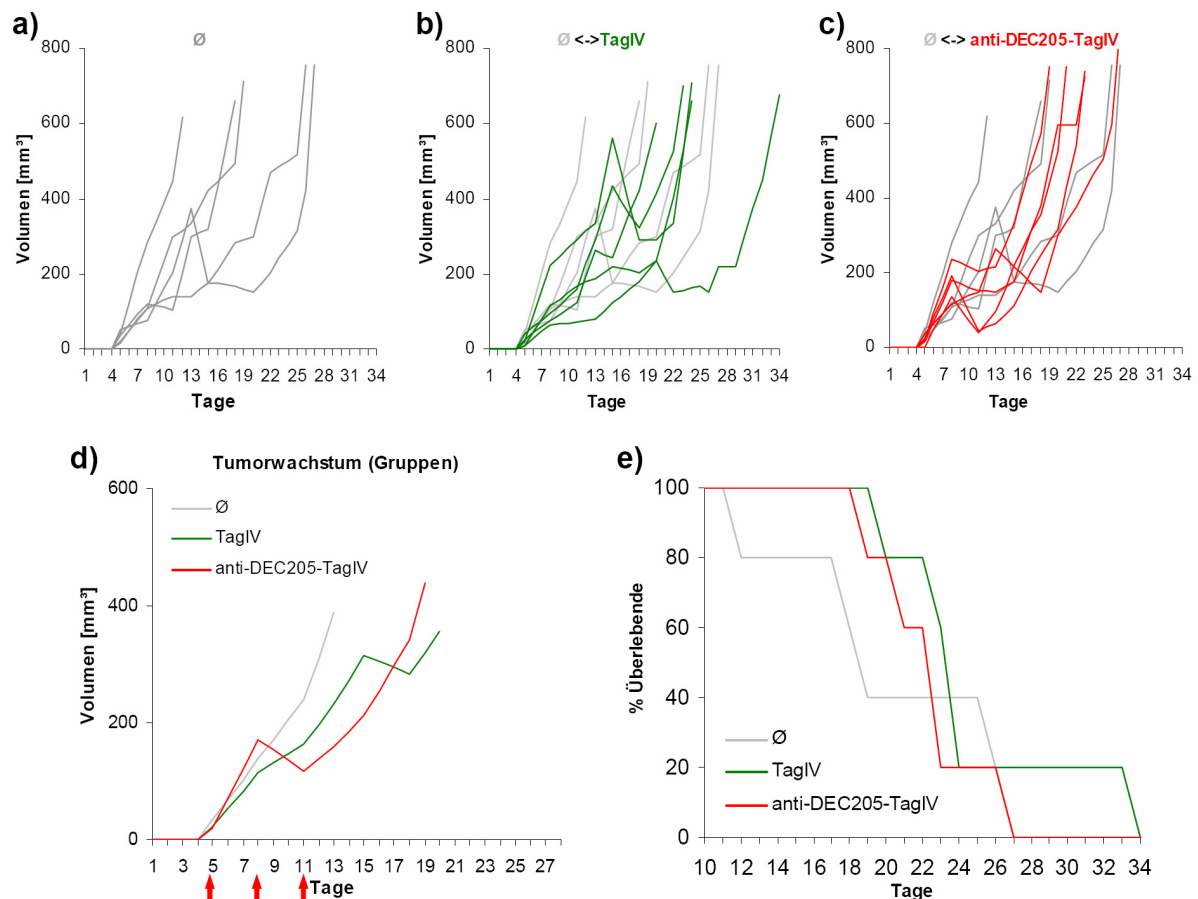


Abbildung 18: Tumorwachstum der RMA-Tag-Tumoren nach Peptid- und Peptid-Konjugat-Behandlung.

(a-c) Individuelle Wachstumskurven der Tumoren der Kontrollgruppe (Ø; a), der Peptid- (grün; b) und Peptid-Konjugat-behandelten Gruppe (rot; c), jeweils im Vergleich mit der Kontrollgruppe (grau hinterlegt). Abbildung d) zeigt die Mittelwerte der einzelnen Gruppen und die Behandlungszeitpunkte (rote Pfeile). e) Überlebenskurve.

3.2.1.3 Verzögerung des Wachstums von RMA-Tag-Tumoren nach anti-DEC205-Tag-Behandlung

Zusätzlich zum Peptid-Konjugat wurden auch das Protein-Konjugat anti-DEC205-Tag und das Tag-Protein zur Vakzinierung in einem Tumorversuch eingesetzt. Beide, Protein und Protein-Konjugat, wurden mit jeweils 50 µg CpG und poly I:C subkutan injiziert. Als Kontrolle dienten nur mit 50 µg CpG und poly I:C behandelte Mäuse. Nach dem Sichtbarwerden der Tumoren folgten drei aufeinander folgenden Behandlungen (Pfeile, Abb. 19d). Anschließend wurde das Tumorwachstum protokolliert.

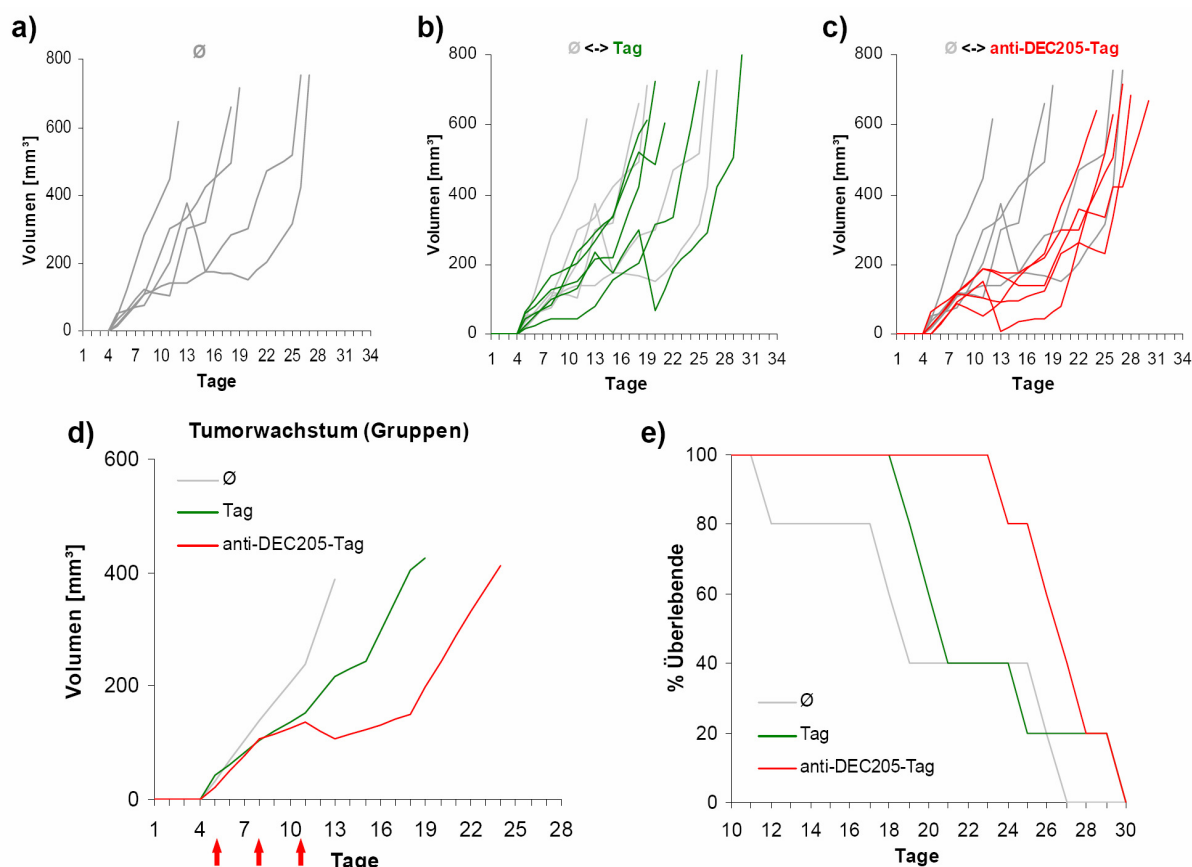


Abbildung 19: Tumorwachstum der RMA-Tag-Tumoren nach Protein- und Protein-Konjugat-Behandlung.

(a-c) Individuelle Wachstumskurven der Tumoren der Kontrollgruppe (Ø; a), der Protein- (grün; b) und Protein-Konjugat-behandelten Gruppe (rot; c), jeweils im Vergleich mit der Kontrollgruppe (grau hinterlegt). Abbildung d) zeigt die Mittelwerte der einzelnen Gruppen und die Behandlungszeitpunkte (rote Pfeile). e) Überlebenskurve.

Nach der Behandlung mit dem Protein-Konjugat anti-DEC205-Tag reduzierte sich das Tumorstadium und blieb ca. eine Woche lang nahezu konstant, bevor die Tumoren wieder schnell an Größe zunahm (Abb. 19c). Dieser Wachstumsverlauf ist auch deutlich in der Gruppenwachstumskurve (Mittelwerte der Gruppen, Abb. 19d) erkennbar. Die Vakzinierung mit ungekoppeltem Tag-Protein führte zwar auch zu einer Verlangsamung des Tumorstadiums gegenüber der Kontrollgruppe, jedoch nicht zu einer Reduzierung des Tumorstadiums während der Behandlung (Abb. 19b). Mit der Protein-Konjugat-Behandlung konnte zwar zu Beginn des Versuchs bei allen Mäusen das Tumorstadium verlangsamt und somit die Überlebensdauer gegenüber der Kontrollgruppe verlängert werden, jedoch hat das progrediente Tumorstadium gegen Ende des Versuchs eine deutliche Verlängerung der Überlebensdauer verhindert (Abb. 19e).

3.2.1.4 Verbesserte Überlebensdauer RMA-Tag-Tumor tragender Mäuse nach fortlaufender Behandlung mit anti-DEC205-Tag

Nachdem mit dreimaliger Vakzinierung mit dem Protein-Konjugat anti-DEC205-Tag ein verzögertes Wachstum der RMA-Tag-Tumoren erzielt werden konnte (Kap. 3.2.1.3), wurden die tumortragenden Mäuse in einem neuerlichen experimentellen Ansatz fortlaufend behandelt. Als Kontrollen dienten Mäuse, die mit Tag-Protein oder ohne Tumor-Antigen behandelt wurden. Allen drei Gruppen wurde bei jeder Behandlung jeweils 50 µg CpG und poly I:C, gegebenenfalls gemeinsam mit dem Protein oder Protein-Konjugat, subkutan injiziert. Mit der Behandlung wurde erst begonnen, nachdem die Tumoren sichtbar waren. Die Mäuse wurden alle vier bis fünf Tage behandelt (Pfeile, Abb. 20d) und das Tumorstadium wurde protokolliert.

Die Mäuse, die mit ungekoppeltem Tag-Protein behandelt wurden, zeigten zwar eine anfängliche Verzögerung des Tumorstadiums (grün, Abb. 20b) gegenüber der Kontrollgruppe ohne Antigen (grau, Abb. 20a und Abb. 20b), jedoch konnte die Überlebensdauer nicht deutlich verlängert werden (Abb. 20e). Die Behandlung der RMA-Tag-Tumor tragenden Mäuse mit anti-DEC205-Tag führte jedoch zu einer Reduzierung des Tumorstadiums. Die Größe der Tumoren blieb sogar teilweise zwei bis drei Wochen lang unter dem Wert, der zum Zeitpunkt der ersten Behandlung gemessen wurde (rot, Abb. 20c). Diese Verzögerung des Tumorstadiums hatte zudem eine Verlängerung der Überlebensdauer von bis zu einer Woche zur Folge (Abb. 20e).

Trotz anfänglicher deutlicher Reduktion des Tumorstadiums und fortlaufender Behandlung nahm das Tumorstadium nach drei bis vier Wochen stark zu. Aus diesem Grund wurde das Immunsystem der Mäuse in der Phase der Tumorstadiumzunahme analysiert. Hierfür wurde ein Interferon-gamma-ELISPOT durchgeführt (Abb. 20f) und die T-Zellen sowie die dendritischen Zellen im Durchflusszytometer untersucht (Abb. 20g und Abb. 22). Für den ELISPOT wurden die Milzzellen aus tumortragenden Mäusen isoliert und mit dem C57Bl/6-spezifischen TagIV-Peptid stimuliert. Nach 24 Stunden Kultur wurden die IFN-gamma-produzierenden T-Zellen über IFN-gamma-Antikörper, einer Peroxidase und DAB-Substrat sichtbar gemacht und gezählt. Hierbei konnte nach anti-DEC205-Tag-Behandlung eine wesentlich höhere Anzahl an positiven Klonen ermittelt werden als bei den Kontrollgruppen (Abb. 20f). Dieses Ergebnis zeigt, dass trotz der

Volumenzunahme des Tumors das Immunsystem nach anti-DEC205-Tag-Behandlung eine gute Antigen-spezifische Aktivierung zeigt.

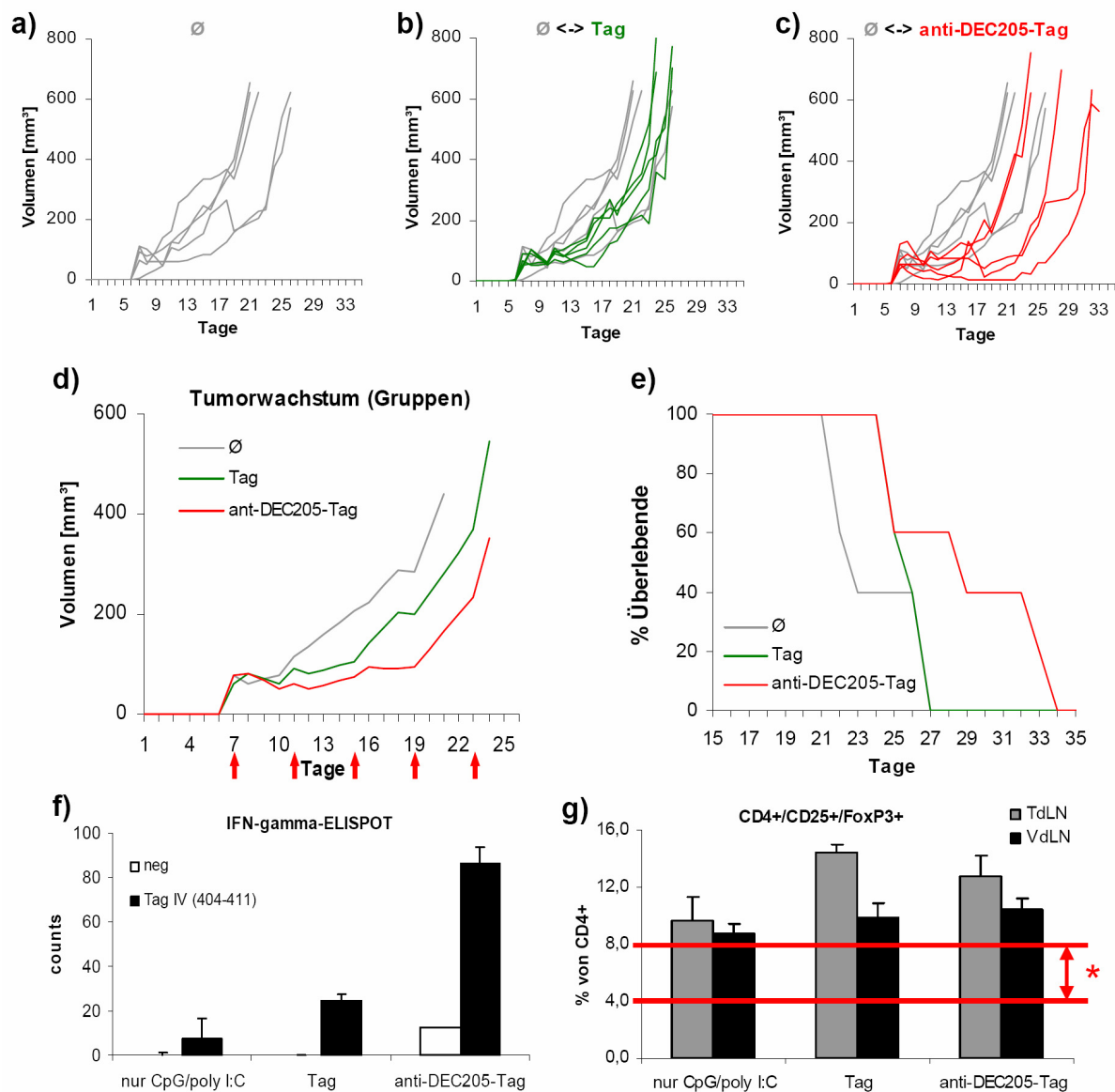


Abbildung 20: Tumorwachstum der RMA-Tag-Tumoren nach fortlaufender Protein- und Protein-Konjugat-Behandlung.

(a-c) Individuelle Wachstumskurven der Tumoren der Kontrollgruppe (Ø, nur CpG/poly I:C; a), der mit Tag-Protein plus CpG/poly I:C (grün; b) und der mit anti-DEC205-Tag-Konjugat plus CpG/poly I:C behandelten Gruppe (rot; c), jeweils im Vergleich mit der Kontrollgruppe (grau hinterlegt). Abbildung d) zeigt die Mittelwerte der einzelnen Gruppen und die Behandlungszeitpunkte (rote Pfeile). e) Überlebenskurve. f) Anzahl der IFN-gamma-positiven T-Zellklone im ELISPOT nach Restimulierung mit (schwarz) oder ohne (weiß) TagIV-Peptid. g) Prozentualer Anteil der CD25/FoxP3-positiven Zellen innerhalb der CD4-positiven Population in den tumordrainierenden Lymphknoten (grau) und den drainierenden Lymphknoten der Vakzinierung (axial und brachial, schwarz). *Anzahl regulatorischer T-Zellen in naiven Mäusen.

Um eventuelle Einflüsse des Tumors auf die dendritischen Zellen und die T-Zellpopulationen zu ermitteln, wurden diese im Durchflusszytometer untersucht. Bei den meisten untersuchten Populationen konnte keine Veränderung festgestellt werden (Kap. 3.2.1.5). Die CD4/CD25/FoxP3-positiven, regulatorischen T-Zellen, zeigten jedoch eine deutliche prozentuale Zunahme innerhalb der CD4-positiven Population (Abb. 20g) gegenüber tumorfreien Mäusen, bei denen zwischen vier und acht Prozent der CD4-positiven T-Zellen CD25/FoxP3-positiv sind. So steht den antigenspezifischen Effektorzellen (anti-DEC205-Tag, Abb. 20f) eine erhöhte Anzahl regulatorischer, suppressiver T-Zellen gegenüber, die die Effektorzellen supprimieren und das Tumorstadium fördern könnten.

3.2.1.5 Synergie von anti-DEC205-Tag-Behandlung und der Depletion der regulatorischen T-Zellen bei RMA-Tag-Tumor tragenden Mäusen

Basierend auf dem Ergebnis, dass RMA-Tag-Tumor tragende Mäuse eine erhöhte Anzahl an regulatorischen T-Zellen aufweisen (Kap. 3.2.1.4), wurden die regulatorischen T-Zellen parallel zur anti-DEC205-Tag-Behandlung depletiert. Dafür wurde den Mäusen vor der ersten anti-DEC205-Tag-Injektion 300 µg anti-CD25-Antikörper (PC61) intraperitoneal injiziert (blaue Pfeile, Abb. 21d). Die Depletion reduziert die Anzahl der regulatorischen T-Zellen auf ein bis zwei Prozent innerhalb der CD4-positiven Population. Nach zwei Wochen wurde die Depletion wiederholt. Zwischen den Injektionen des anti-CD25-Antikörpers wurden die Mäuse dreimal mit anti-DEC205-Tag-Konjugat plus CpG/poly I:C (rot, Abb. 21c) vakziniert (rote Pfeile, Abb. 21d). Als Kontrollen dienten tumortragende Mäuse, denen nur CpG/poly I:C (grau, Abb. 21a-c), CpG/poly I:C in Kombination mit anti-CD25 (blau, Abb. 21a) oder unkonjugiertes Tag-Protein plus CpG/poly I:C in Kombination mit anti-CD25 (grün, Abb. 21b) verabreicht wurde.

Die Depletion der regulatorischen T-Zellen allein hatte anfänglich keinen Einfluss auf das Tumorstadium (blau, Abb. 21a). Bei zwei Mäusen kam es aber zum Zeitpunkt der zweiten Depletion zu Abstoßungsreaktionen. Während bei einer Maus der Tumor wieder anfangen an Volumen zuzunehmen, wurde der Tumor der anderen Maus ganz abgestoßen (Abb. 21f). Die Kombinationsbehandlung von Depletion und Tag-Protein-Vakzinierung (grün, Abb. 21b) führte bei den meisten Mäusen zu einer Verzögerung des Tumorstadiums. Darüber hinaus konnte auch die Überlebensdauer etwas

verlängert werden (Abb. 21e), jedoch kam es zu keiner Abstoßung eines Tumors (Abb. 21f).

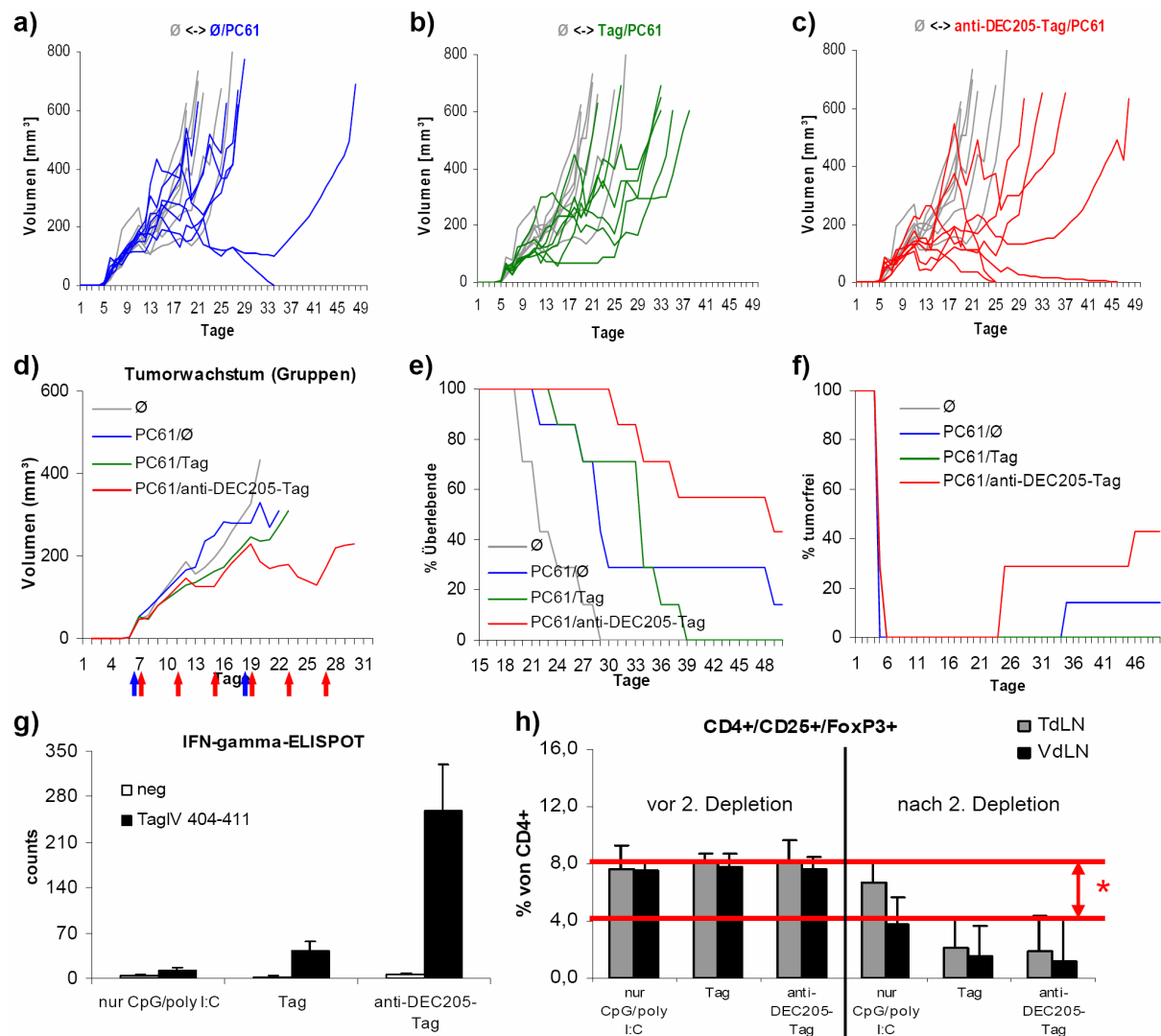


Abbildung 21: Tumorwachstum der RMA-Tag-Tumoren nach fortlaufender Protein- und Protein-Konjugat-Behandlung in Kombination mit der Depletion regulatorischer T-Zellen.

(a-c) Individuelle Wachstumskurven der Tumoren der Kontrollgruppe (grau; a), der Gruppe der nur anti-CD25-Antikörper verabreicht wurde (blau; a), der Tag-Protein plus CpG/poly I:C und anti-CD25 behandelten (grün; b) und der anti-DEC205-Tag-Konjugat plus CpG/poly I:C und anti-CD25 behandelten Gruppe (rot; c), jeweils im Vergleich mit der Kontrollgruppe (grau hinterlegt). Abbildung d) zeigt die Mittelwerte der einzelnen Gruppen und die Vakzinierungszeitpunkte (rote Pfeile) und die Zeitpunkte der Depletion (blaue Pfeile). e) Überlebenskurve. f) prozentualer Anteil der tumorfreien Mäuse. g) Anzahl der IFN-gamma-positiven T-Zellklone der depletierten, tumortragenden Mäuse im ELISPOT nach Restimulation mit (schwarz) oder ohne (weiß) TagIV-Peptid. h) Prozentualer Anteil der CD25/FoxP3-positiven Zellen innerhalb der CD4-positiven Population in den tumordrainierenden Lymphknoten (grau) und den drainierenden Lymphknoten der Vakzinierung (axial und brachial, schwarz). Die tumortragenden Mäuse wurden zu zwei Zeitpunkten unmittelbar vor und zwei Tage nach der zweiten Depletion untersucht. *Anzahl regulatorischer T-Zellen in naiven Mäusen.

Bei der Kombinationsbehandlung von anti-DEC205-Tag-Konjugat und depletierendem anti-CD25-Antikörper kam es bei allen Mäusen zu einer Verzögerung des Tumorwachstums (rot, Abb. 21c) und zu einer Verlängerung der Überlebensdauer (Abb. 21e). Fast die Hälfte der so behandelten Mäuse konnte den Tumor ganz abstoßen (Abb. 21f).

Wie schon im vorigen Experiment (Kap. 3.2.1.4) beschrieben, wurden auch hier die Effektorzellen und die regulatorischen T-Zellen der tumortragenden Mäuse untersucht. Die Aktivierung der Antigen-spezifischen Effektorzellen wurde wie zuvor mittels eines IFN-gamma-ELISPOTs ermittelt (Abb. 21g). Die mit anti-DEC205-Tag und anti-CD25 behandelten Mäuse zeigten eine sehr gute Aktivierung, sodass davon auszugehen ist, dass die Verabreichung des anti-CD25-Antikörpers keinen negativen Einfluss auf die Aktivierung der Effektorzellen hat.

Parallel dazu wurde die Anzahl der CD25/FoxP3-positiven Zellen innerhalb der CD4-Population zu zwei Zeitpunkten untersucht, einmal unmittelbar vor der zweiten Depletion (Tag 18), also zwei Wochen nach der ersten Depletion. Hier zeigt sich, dass die nach der ersten Depletion reduzierte Zellzahl wieder auf ca. 8% angestiegen ist (vor 2. Depletion, Abb. 21h). Die zweite Analyse kurz nach der zweiten Depletion (Tag 20) zeigt, dass mit der zweiten Depletion der Anteil der CD25/FoxP3-positiven Zellen wieder deutlich verringert werden konnte (nach 2. Depletion, Abb. 21h).

Die Depletion ohne anti-DEC205-Tag-Behandlung führte zwar zur Abstoßung eines Tumors, jedoch blieb das Tumorwachstum der meisten Mäuse unbeeinflusst, vergleicht man es mit der Kontrollgruppe (grau/blau, Abb. 21a). Eine verlässliche Abstoßungsrate der Tumoren war nur zu beobachten, wenn die tumortragenden Mäuse zusätzlich zur anti-CD25-Behandlung mit anti-DEC205-Tag behandelt wurden (Abb. 21c). Somit zeigt sich ein Synergieeffekt zwischen der antigenspezifischen Aktivierung des Immunsystems durch die anti-DEC205-Tag-Behandlung und der Reduktion der Anzahl der regulatorischen T-Zellen.

Um den Einfluss der anti-CD25-Injektion auf das Immunsystem zu analysieren, wurden die dendritischen Zellen und die T-Zellen auf Aktivierungsmarker hin untersucht (Abb. 22). Die Zellen der tumortragenden Mäuse wurden drei Wochen nach Setzen des Tumors im Durchflusszytometer analysiert. Dafür wurden nicht depletierte Mäuse (ohne Depletion), Mäuse zwei Wochen nach der ersten Depletion,

also unmittelbar vor der zweiten Depletion (vor 2. Depletion) und Mäuse zwei Tage nach der zweiten Depletion untersucht (nach 2. Depletion). Innerhalb dieser drei Gruppen wurden die Mäuse nach dem Sichtbarwerden der Tumoren alle vier bis fünf Tage wie angegeben behandelt. Die Gruppen waren im Einzelnen: Nur CpG/poly I:C (I), Tag-Protein plus CpG/poly I:C (II) oder anti-DEC205-Tag-Konjugat plus CpG/poly I:C (III). Es wurden jeweils drei Mäuse analysiert.

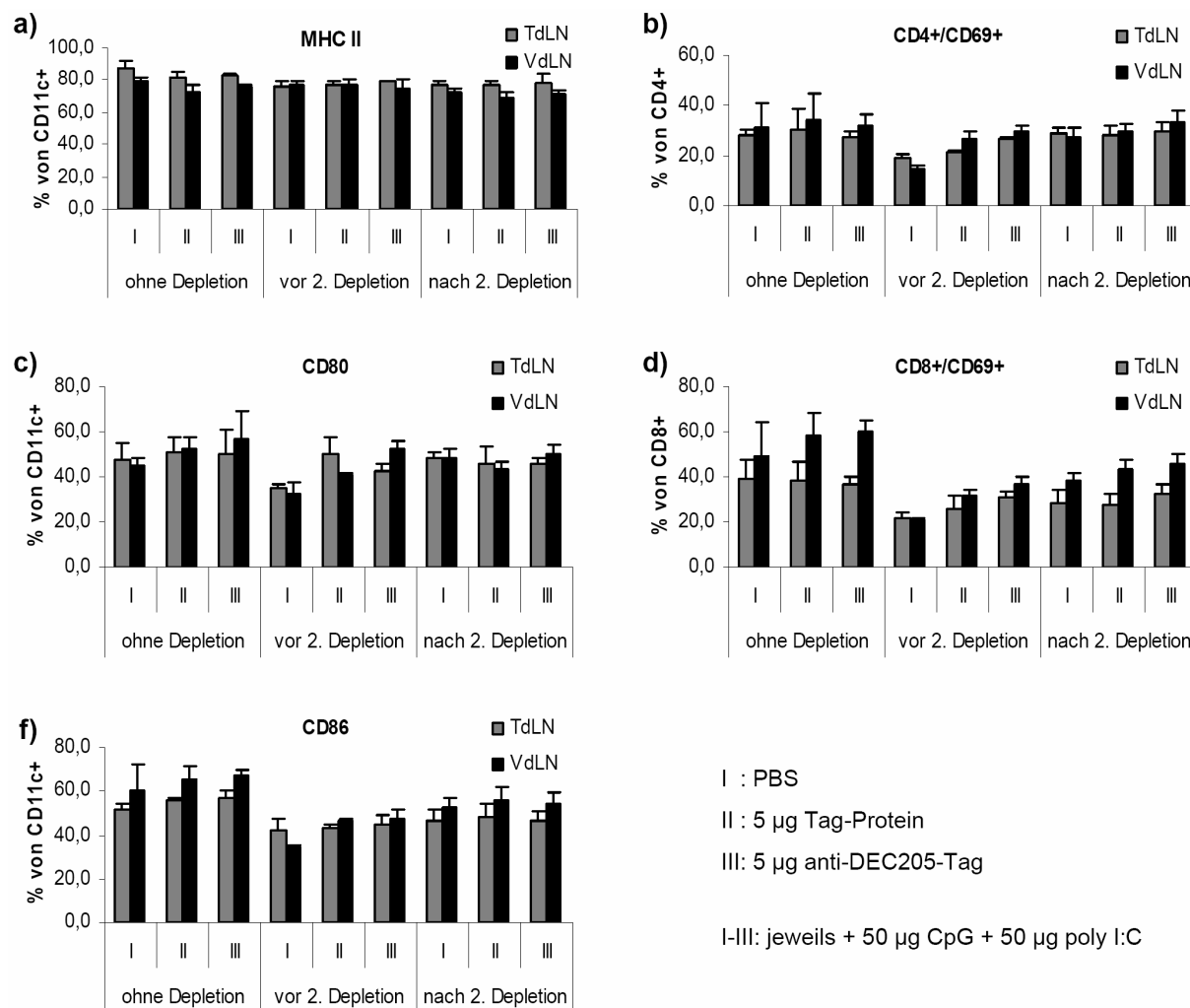


Abbildung 22: Aktivierung der dendritischen Zellen und der T-Zellen nach Vakzinierung, mit und ohne Depletion der regulatorischen T-Zellen.

Prozentualer Anteil der CD11c-positiven Zellen die MHC II-positiv (a) CD80-positiv (c) oder CD86-positiv (e) sind. Prozentualer Anteil der CD69-positiven Zellen innerhalb der CD4-positiven (b) oder CD8-positiven (d) T-Zell-Population. Es wurden jeweils die Zellen der tumordrainierenden Lymphknoten (grau) und der drainierenden Lymphknoten der Vakzinierung (axial und brachial, schwarz) analysiert. Die Mäuse wurden drei Wochen nach Setzen des Tumors untersucht und blieben entweder ohne Depletion oder wurden unmittelbar vor oder zwei Tage nach der zweiten Depletion untersucht. Parallel wurden die Mäuse nach sichtbar werden des Tumors alle vier bis fünf Tage wie angegeben vakzinisiert (I-III, n=3).

Alle untersuchten Mäuse zeigten eine gute Aktivierung des Immunsystems, da alle mit CpG/poly I:C behandelt wurden. Dies konnte bereits in Kapitel 3.2.1.1 (Abb. 17) gezeigt werden. Der prozentuale Anteil der MHC II-positiven CD11c-positiven zeigt in Abhängigkeit der verschiedenen Behandlungskombinationen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 22a), nur der Aktivierungsmarker CD80 zeigt im Falle der nur mit CpG/poly IC behandelten Mäuse vor der zweiten Depletion reduzierte Werte (vor 2. Depletion/I, Abb. 22c). Diese Gruppe zeigt auch für den Aktivierungsmarker CD86 (Abb. 22f) und für den Aktivierungsmarker CD69 auf CD4-positiven (Abb. 22b) und auf CD8-positiven T-Zellen (Abb. 22d) die geringsten Werte. Dabei ist zu beachten, dass durch die antigenspezifische Vakzinierung in den Gruppen II (Tag-Protein) und III (anti-DEC205-Tag-Konjugat) bei längerer Behandlungsdauer (hier zwei Wochen) evtl. eine substantiellere Immunantwort ausgelöst wird. Die teilweise geringer aktivierten CD8-positiven T-Zellen bei depletierten Mäusen spiegelt hier nur die Anzahl der aktivierten, jedoch nicht der Antigen-spezifisch aktivierten CD8-positiven T-Zellen wieder. Abschließend kann gesagt werden, dass die Depletion keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivierung des Immunsystems hinsichtlich der untersuchten Marker zeigt.

3.2.1.6 Depletion der regulatorischen T-Zellen in B16-Tag-Tumor tragenden Mäusen

Im vorhergehenden Kapitel (Kap. 3.2.1.5) konnte gezeigt werden, dass sich im RMA-Tag-Tumormodell ein Synergieeffekt aus der DC-gerichteten Vakzinierung mit anti-DEC205-Tag-Konjugat und der Depletion der regulatorischen T-Zellen mit anti-CD25-Antikörper ergibt. Vom B16-Tumormodell ist jedoch bekannt, dass die Depletion der regulatorischen T-Zellen bei schon bestehendem Tumor eher zur Beschleunigung des Tumorwachstums führt (S. Schallenberg, unveröffentlichte Daten). Im Folgenden experimentellen Ansatz wurde daher untersucht, ob die anti-DEC205-Tag-Behandlung bei den nahe verwandten B16-Tag-Tumoren von der anti-CD25-Behandlung beeinflusst wird.

Dafür wurde den Mäusen vor der ersten anti-DEC205-Tag-Injektion 300 µg anti-CD25-Antikörper (PC61) intraperitoneal injiziert (blauer Pfeil, Abb. 23d). Die Depletion reduziert die Anzahl der regulatorischen T-Zellen auf ein bis zwei Prozent der CD4-positiven T-Zellen. Anschließend wurden die Mäuse dreimal mit anti-DEC205-

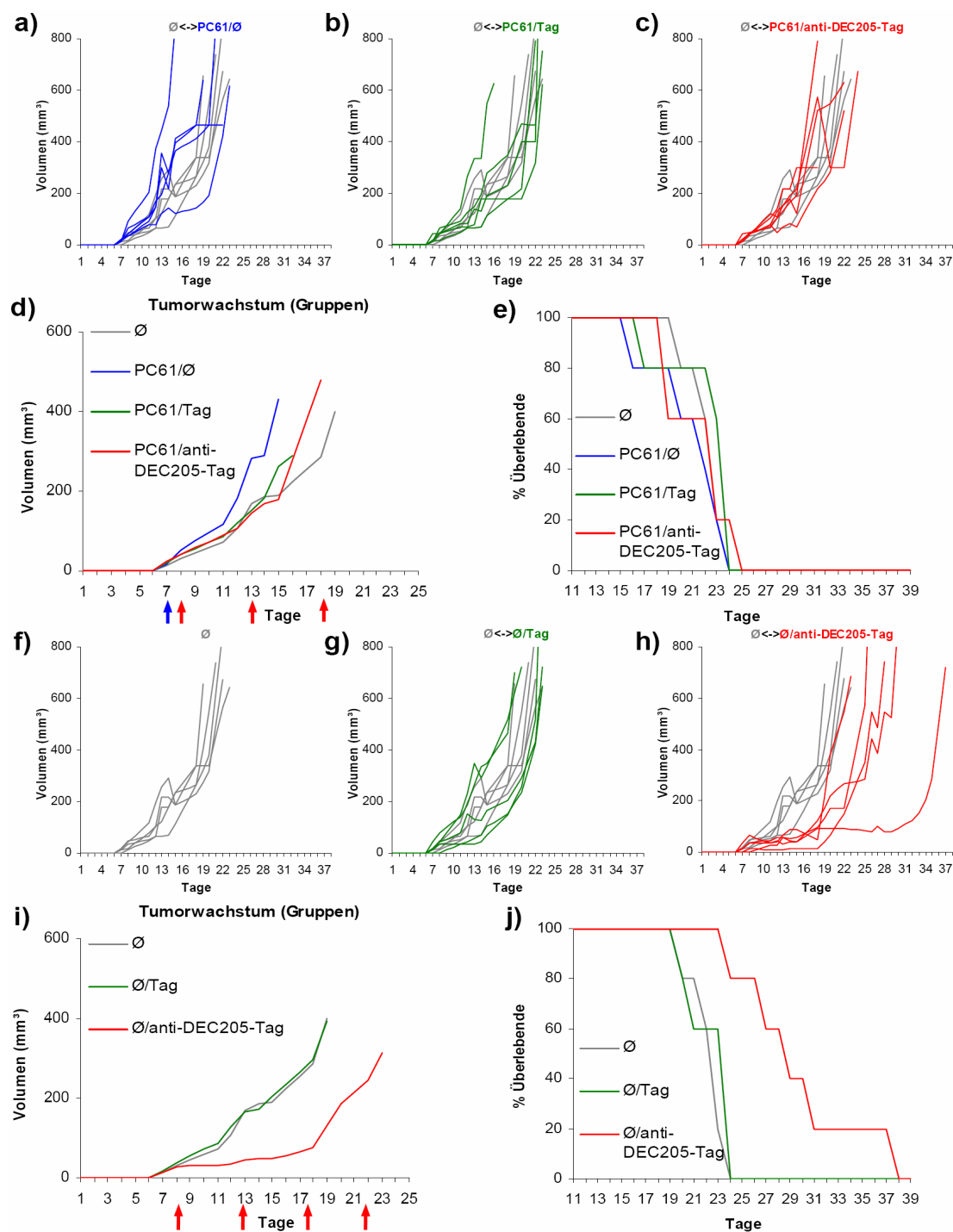


Abbildung 23: Einfluss der Depletion regulatorischer T-Zellen auf die anti-DEC205-Tag-Behandlung bei B16-Tag-Tumor tragenden Mäusen.

(a-c) Individuelle Wachstumskurven der Tumoren der Kontrollgruppe (grau; a), der Gruppe der nur CpG/poly I:C und der anti-CD25-Antikörper verabreicht wurde (blau; a), der Tag-Protein plus CpG/poly I:C und anti-CD25 behandelten (grün; b) und der anti-DEC205-Tag-Konjugat plus CpG/poly I:C und anti-CD25 behandelten Gruppe (rot; c), jeweils im Vergleich mit der Kontrollgruppe (grau hinterlegt). d) und i) zeigen die Mittelwerte der einzelnen Gruppen und die Vakzinierungszeitpunkte (rote Pfeile) und den Zeitpunkt der Depletion (blauer Pfeil). e) und j) Überlebenskurve. (f-h) Individuelle Wachstumskurven der Tumoren der Kontrollgruppe (grau; f), der Tag-Protein plus CpG/poly I:C behandelten (grün; g) und der anti-DEC205-Tag-Konjugat plus CpG/poly I:C behandelten Gruppe (rot; h), jeweils im Vergleich mit der Kontrollgruppe (grau hinterlegt).

Tag-Konjugat plus CpG/poly I:C (rot, Abb. 23c) vakziniert (rote Pfeile, Abb. 23d). Als Kontrollen dienten tumortragende Mäuse, denen nur CpG/poly I:C (grau, Abb. 23a-c und f-h), CpG/poly I:C in Kombination mit anti-CD25 (blau, Abb. 23a) oder unkonjugiertes Tag-Protein plus CpG/poly I:C in Kombination mit anti-CD25 (grün, Abb. 23b) verabreicht wurde. Um den Einfluss der Depletion auf die Antigen-spezifische Vakzinierung zu testen, wurden Mäuse nur mit Tag-Protein plus CpG/poly I:C (grün, Abb. 23g) oder anti-DEC205-Tag-Konjugat plus CpG/poly I:C behandelt (rot, Abb. 23h).

Wie bereits von S. Schallenberg im B16-Tumormodell dargestellt, zeigte sich nach Gabe des anti-CD25-Antikörpers ein beschleunigtes Tumorwachstum (Abb. 23a und d). Die Tag-Protein-Behandlung sowie die Kombination aus Tag-Protein- und anti-CD25-Behandlung führten zu keiner Veränderung des Tumorwachstums gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 23b und g). Ebenso war eine Kombination aus anti-DEC205-Tag-Behandlung und Depletion der regulatorischen T-Zellen erfolglos (Abb. 23c). Dies spiegeln auch die Gruppenwachstumskurven (Abb. 23d und i) und die Überlebensdaten (Abb. 23e und j) wider. Einzig die alleinige DC-gerichtete Vakzinierung mit anti-DEC205-Tag führte zu einer deutlichen Verlangsamung bzw. zum kompletten Aufhalten des Tumorwachstums in den ersten zehn Tagen der Wachstumsphase (Abb. 23h und i) was sich auch am deutlich längeren Überleben der Mäuse zeigte (Abb. 23j).

So waren im B16-Tag-Tumormodell keine Synergieeffekte zwischen der Antigen-spezifischen Vakzinierung und der Depletion der regulatorischen T-Zellen festzustellen. Nur die Monotherapie mit anti-DEC205-Tag konnte wesentlich zur Verbesserung der Überlebensrate beitragen.

3.2.1.7 Verteilung der regulatorischen T-Zellen in den unterschiedlichen Organen verschiedener Tumormodelle

Bei der Behandlung RMA-Tag-Tumor tragender Mäuse hat sich gezeigt, dass die Anzahl der regulatorischen T-Zellen vor allem in den tumordrainierenden Lymphknoten ansteigt und dass die Reduktion durch Gabe von anti-CD25-Antikörper eine Abstoßung des Tumors erzielt werden konnte. Bei B16-Tag-Tumor tragenden Mäusen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Injektion von anti-CD25-Antikörper in bereits tumortragende Mäuse zu einer Beschleunigung des Tumorwachstums führt (Kap. 3.2.1.6). Um diese gegensätzlichen Befunde zu untersuchen, wurde die Anzahl

der regulatorischen T-Zellen in den unterschiedlichen Organen von tumortragenden Mäusen verschiedener Tumormodelle untersucht.

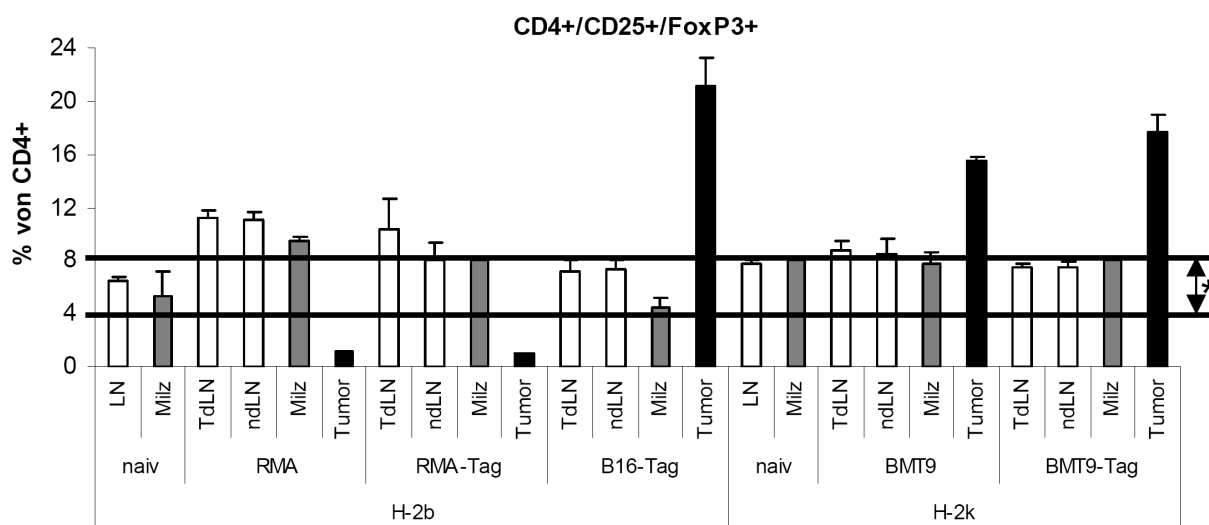


Abbildung 24: Verteilung regulatorischer T-Zellen in den verschiedenen Organen naiver und tumortragender Mäuse.

Prozentualer Anteil der CD25/FoxP3-positiven T-Zellen innerhalb der CD4-positiven T-Zell-Population. Angegeben ist der Anteil der regulatorischen T-Zellen in den tumordrainierenden Lymphknoten (TdLN), den nicht drainierenden Lymphknoten (ndLN) den Milzen und Tumoren unbehandelter, tumortragender Mäuse des angegebenen Tumormodells. Zum Vergleich ist der Anteil der regulatorischen T-Zellen in den Lymphknoten (LN) und Milzen von naiven Mäusen des jeweiligen Mausstamms (H-2b: C57Bl/6, H-2k: C3H) angegeben.

In den sekundären lymphoiden Organen, der Milz und den Lymphknoten naiver Mäuse, liegt der Anteil der regulatorischen T-Zellen innerhalb der CD4-positiven T-Zell-Population zwischen vier und acht Prozent (siehe auch Abb. 24). Die RMA-Tag-Tumor tragenden Mäuse zeigen hier erhöhte Werte. In den Tumoren dieser Mäuse ist nur eine geringe Anzahl an regulatorischen T-Zellen zu finden (Abb. 24). Die B16-Tag-Tumor tragenden Mäuse haben hingegen eine mit den naiven Mäusen vergleichbare Anzahl der regulatorischen T-Zellen in den sekundären lymphoiden Organen. Jedoch zeigt sich in diesen Tumoren ein sehr hoher Anteil von Tumordinfiltrierenden, regulatorischen T-Zellen, der Werte von über 20 Prozent annehmen kann. Diese Frequenz der tumordinfiltrierenden, regulatorischen T-Zellen stimmt mit den Werten der tumortragenden Mäuse des nicht Tag-transgenen B16-Tumormodells überein (S. Schallenberg, unveröffentlichte Daten). Eine sehr ähnliche Verteilung zeigt auch das BMT-9-Tumormodell und das entsprechend Tag-transgene Modell BMT-9-Tag (Abb. 24). Hier wurde ebenfalls eine stark erhöhte Frequenz von regulatorischen T-Zellen im Tumorgewebe festgestellt, hingegen wiesen die

sekundären lymphoiden Organe normale Zellzahlen auf. Von den regulatorischen T-Zellen ist bekannt, dass sie sich im Tumorgewebe des B16-Tumors durch die Gabe von anti-CD25-Antikörper nicht depletieren lassen (S. Schallenberg, unveröffentlichte Daten). Die regulatorischen T-Zellen in den sekundären lymphoiden Organen lassen sich hingegen gut durch die Gabe von anti-CD25-Antikörper depletieren. Somit lässt sich die erhöhte Anzahl der regulatorischen T-Zellen in den Lymphknoten RMA-Tag-Tumor tragender Mäuse reduzieren. Dies deutet darauf hin, dass die Verteilung der regulatorischen T-Zellen in den verschiedenen Organen für einen Behandlungserfolg mit depletierenden anti-CD25-Antikörpern entscheidend ist. So hatte eine Depletion nur dann Erfolg, wenn wenige regulatorische T-Zellen im Tumor gemessen wurden.

3.2.2 Verlängerte Überlebensdauer von tumortragenden RIP1-Tag5-Mäusen nach anti-DEC205-Tag-Behandlung

In den Mäusen des autochthonen RIP1-Tag5-Tumormodells wird das Tag-Protein unter der Kontrolle des Ratten-Insulinpromotors (RIP) organspezifisch in den beta-Zellen des Pankreas exprimiert. Dies führt zur Entstehung eines Tumors im Pankreas (in Kapitel 2.3.4.4 näher beschrieben). Ein solch spontanes Tumormodell spiegelt die klinische Situation viel besser wider, als Transplantations-Tumormodelle und eine anti-DEC205-Therapie sollte daher in diesem kliniknahen Modell getestet werden.

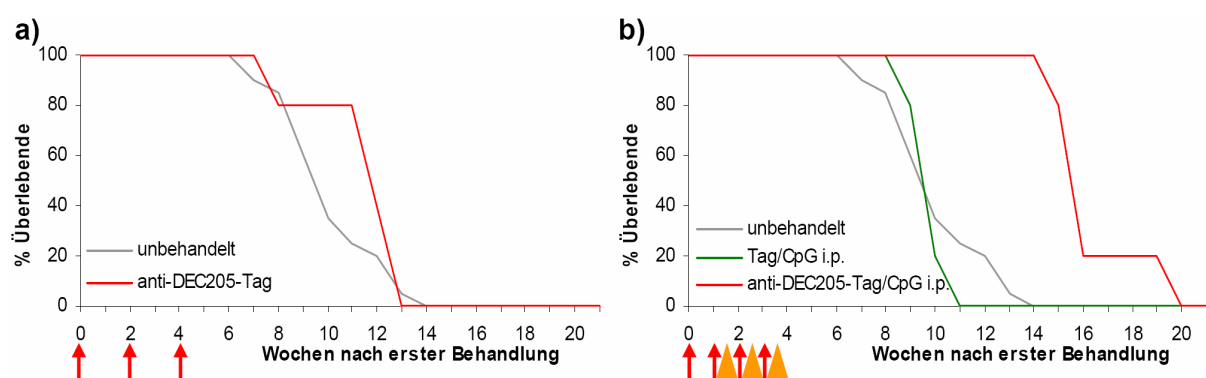


Abbildung 25: Überlebensdauer von RIP1-Tag5-Mäusen nach Behandlung mit anti-DEC205-Tag.

RIP1-Tag5-Mäuse wurden ab dem Alter von 22 Wochen behandelt. **a)** Behandlung mit 5 µg anti-DEC205-Tag (rote Pfeile). **b)** Behandlung mit 50 µg Tag oder 5 µg anti-DEC205-Tag (rote Pfeile) und 50 µg CpG i.p. (orange Pfeile). Die Überlebensdauer der unbehandelten Mäuse ist jeweils zum Vergleich mit angegeben (grau, **a** und **b**).

Im ersten experimentellen Ansatz wurden die Mäuse mit Konjugat behandelt. Dafür wurde den Mäusen in drei aufeinander folgenden Injektionen im Abstand von 14 Tagen 5 µg anti-DEC205-Tag zusammen mit 50 µg CpG subkutan injiziert. Die Überlebensdauer war hier vergleichbar mit unbehandelten Mäusen (Abb. 25a). Obwohl im „*in vivo* kill“-Assay (Kap. 3.1.5.1, Abb. 13d) und im *in vivo* Proliferations-Assay (Kap. 3.1.5.3, Abb. 15) nach anti-DEC205-Tag-Immunisierung eine gute antigenspezifische Immunantwort ausgelöst werden konnte, zeigt sich hier kein Effekt. Die histologische Untersuchung 25 Wochen alter, tumortragender RIP1-Tag5-Mäuse nach zweimaliger Injektion von anti-DEC205-Tag hat keine signifikant höhere Infiltration von Effektorzellen gezeigt (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich konnten die aktivierten Effektorzellen den Tumor nicht infiltrieren.

Es ist bekannt, dass das Tumorendothel durch die systemische Gabe von CpG aktiviert werden kann, um eine Infiltration der Effektorzellen zu ermöglichen.⁶² Aus diesem Grund wurde den Mäusen zusätzlich zur Vakzinierung CpG intraperitoneal gegeben. Im nächsten Experiment wurde den Mäusen viermal im Abstand von einer Woche entweder 50 µg Tag-Protein oder 5 µg anti-DEC205-Tag, jeweils plus 50 µg CpG subkutan injiziert (rote Pfeile, Abb. 25b). Zusätzlich wurde den Mäusen, beginnend nach der zweiten Vakzinierung, 50 µg CpG intraperitoneal verabreicht. Die CpG-Behandlung erfolgte jeweils drei Tage nach der Vakzinierung (orange Pfeile, Abb. 25b). Die Kombinationsbehandlung von Tag-Protein und der Gabe von CpG i.p. zeigte keine Verlängerung der Überlebensdauer. Im Gegensatz dazu verlängerte die Kombinationstherapie mit Gabe von anti-DEC205-Tag und CpG i.p. die Überlebensdauer dieser Mäuse um bis zu zehn Wochen. Zwar konnte keine der Mäuse geheilt werden, jedoch ist eine solche Verlängerung der Überlebensdauer in diesem schwer zu therapierenden Tumormodell trotzdem ein großer Erfolg.

3.3 Klonierung der ScFv-Fusionsantikörper

Als Alternative zu den chemisch gekoppelten Konjugaten wurde ein System zur bakteriellen Expression von Fusionsantikörpern etabliert. Bei diesen Fusionsantikörpern wird die „Single chain Fragment variable“-Region (ScFv), d.h. die Bindungsregion bestehend aus den variablen Fragmenten einer schweren und einer leichten Kette eines Antikörpers, mit einem Antigen C-terminal fusioniert. Der Vorteil dieser Antikörperkonstrukte ist die Flexibilität bei der Wahl der zu fusionierenden Antigene, denn prinzipiell können alle Sequenzen mittels cDNA in ein solches Konstrukt integriert werden. Darüber hinaus lassen sich relativ leicht größere Mengen produzieren.

Dieses Projekt wurde in enger Zusammenarbeit mit T. Johnson durchgeführt.

3.3.1 Klonierung der variablen Regionen

Zu Beginn mussten die für die variablen Regionen codierenden DNA-Sequenzen aus Hybridomzellen gewonnen werden. Dafür wurde die RNA aus anti-DEC205 produzierenden Zellen (HB290) isoliert und mittels reverser Transkription in DNA umgeschrieben. Diese DNA diente dann als Templat für die darauf folgende Polymerase Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung der variablen Regionen. Für die PCR standen mehrere Primerkombinationen zur Verfügung. Diese Primer binden in einem relativ konservierten, konstanten Bereich der Antikörpersequenz. Trotzdem ist es notwendig, gewisse Unterschiede in den Sequenzen auszugleichen. Darüber hinaus handelt es sich bei diesen Primern um degenerierte Primer, die an bestimmten Positionen ihrer Sequenz variieren, um zusätzlich die Wahrscheinlichkeit der Bindung am Templat zu erhöhen. Alle Primer verfügen über Schnittstellen für Restriktionsenzyme, was eine direkte Klonierung des PCR-Produkts erlaubt (Primersequenzen, siehe Anhang).

Für die PCR der Sequenz der leichten Kette, im Falle des anti-DEC205-Antikörpers eine kappa-Kette, standen zwei Vorwärtsprimer und drei Rückwärtsprimer zur Verfügung. Die Rückwärtsprimer wurden gleichzeitig im Verhältnis 1:1 eingesetzt, die dazugehörigen Vorwärtsprimer jeweils in separaten Reaktionen. Die Kombination aus dem Gemisch der Vorwärtsprimer moJkForNot1 und moJkForNot2 und dem Rückwärtsprimer moVkBackApaL3 ergab das gewünschte PCR-Produkt (Annealing-

temperaturen: 50°C/5 Zyklen, 55°C/5 Zyklen, 60°C/25 Zyklen; VL, Abb. 26b). Für die Amplifizierung der schweren Kette standen ein Vorwärtsprimer und zwei Rückwärtsprimer zur Verfügung, wobei die Kombination aus moVHForXho und moVHBackSfi das gewünschte PCR-Produkt ergab (Annealingtemperaturen: 60°C/5 Zyklen, 65°C/5 Zyklen, 70°C/25 Zyklen; VH, Abb. 26b).

Im Anschluss an die PCR wurden die PCR-Produkte in den Klonierungsvektor pHEN3 kloniert, der bereits über eine Linkersequenz verfügte (I, Abb. 26a), um die Sequenzen der schweren und leichten Kette zu verbinden. Dafür wurden das PCR-Produkt der schweren Kette und der Vektor mit den Enzymen für *SfiI* und *XhoI* geschnitten und das Insert mittels Ligation in den Vektor kloniert (II, Abb. 26a). Vor der Ligation wurde der Vektor dephosphoriliert. In einem weiteren Klonierungsschritt wurde auf gleiche Weise das Insert für die leichte Kette unter der Verwendung der Enzyme für *ApaI* und *NotI* kloniert (III, Abb. 26a).

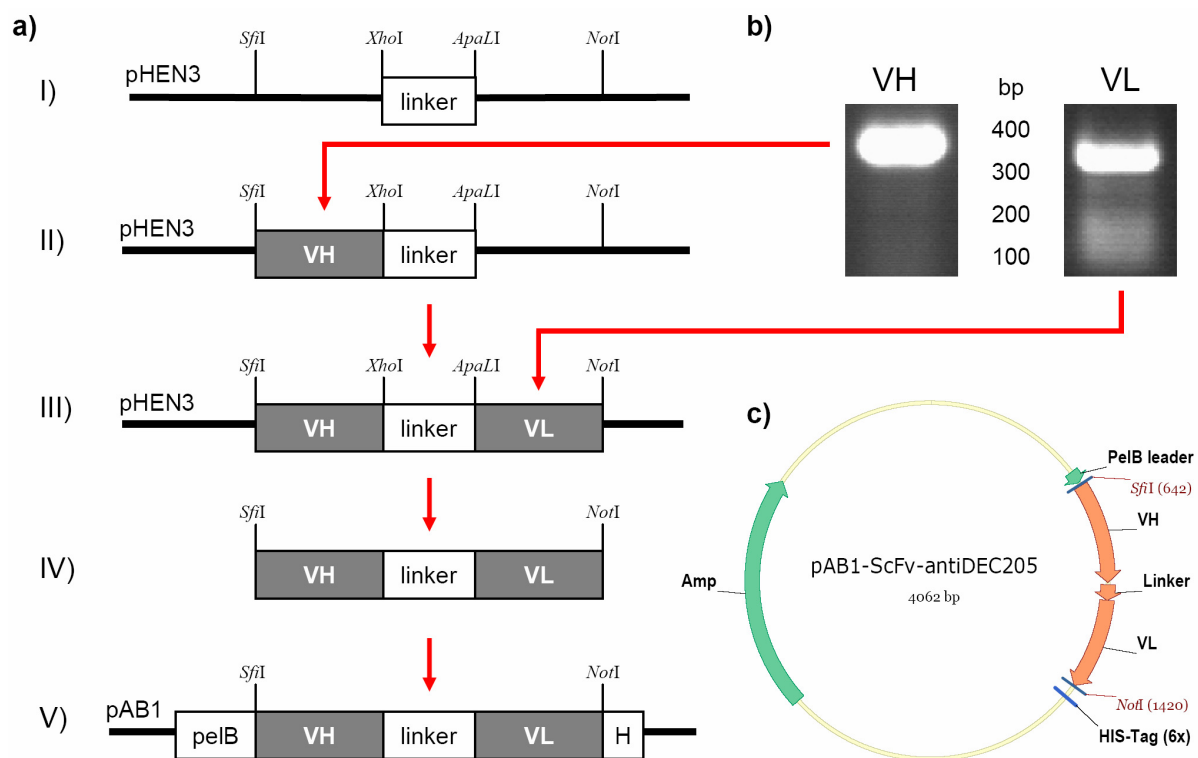


Abbildung 26: Klonierung des anti-DEC205-„Singel chain Fragment variable“ (ScFv).

a) Nach der Generierung der für die variablen Regionen der schweren (VH) und der leichten Kette (VL) des Antikörpers codierenden Gensequenzen mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurden diese in den Klonierungsvektor pHEN3 kloniert (I-III). Die nun über eine Linkersequenz (linker) verbundenen Sequenzen VH und VL wurden anschließend gemeinsam in den Expressionsvektor pAB1 kloniert (IV-V; H: HIS-Tag). **b)** PCR-Produkte VH und VL nach Auftrennung im Agarosegel. **c)** Plasmidkarte des pAB1-ScFv-antiDEC205-Expressionsvektors (Amp: Ampicillin-Resistenzgen).

Die so fusionierte Sequenz des ScFv besteht aus dem Fragment für die schwere Kette, dem Linker und dem Fragment für die leichte Kette (VH-linker-VL, IV). Unter Verwendung der Enzyme für *Sfi*I und *Not*I wurde diese dann aus dem Klonierungsvektor ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pAB1 mittels Ligation überführt (IV-V, Abb. 26a). Die Abbildung 26c) zeigt die Plasmidkarte des Expressionsvektors. Dem ScFv ist die „PelB leader“-Sequenz vorgeschaltet. Sie sorgt für den Transport des exprimierten Konstrukts in das Periplasma der Bakterienzelle, den Zwischenraum zwischen der Zytoplasmamembran und der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien. Im Anschluss an die Expression wird dann die äußere Membran lysiert und das produzierte Protein freigegeben. Ein C-terminaler HIS-Tag ermöglicht die Aufreinigung des Proteins über dafür spezifische Ni-NTA-Säulen.

Ausser für den murinen anti-DEC205 ScFv wurden noch als Kontrollen ein MHC II-bindender ScFv (Hybridom TIB120) und ein beta-Galactosidase-ScFv (Hybridom GI117), sowie ein ScFv für den humanen anti-DEC205 (Hybridom MG38) hergestellt. Die produzierten ScFv-Proteine wurden bereits von T. Johnson erfolgreich auf ihre Bindungsfähigkeit hin untersucht.

3.3.2 Klonierung der Tag-Sequenz für die Fusionsantikörper

In die in 3.3.1 generierten ScFv-Expressionsvektoren wurden nun für die Expression verschiedener Fusionsantikörper diverse Antigene kloniert. Für die vorliegende Arbeit sollte ein anti-DEC205-Tag-ScFv generiert werden. Da das gesamte Tag-Protein (SV40 Large T Antigen) relativ groß ist, wurde eine Region (Aminosäuren 335-578) des Proteins ausgewählt, die für weiterführende Experimente wichtige Peptidsequenzen enthält. Dies sind die Peptide TagIV (H-2b), TCR1 und TCRCD8 (beide H-2k, Abb. 27a).

Die dafür kodierende DNA-Sequenz wurde mittels PCR gewonnen. Als Templat diente das Plasmid pTriEX-3Hygro-Tag. Zudem kamen die Primer Tagpep-*Not*I-for und Tagpep-*Not*I-rev zum Einsatz (Annealingtemperaturen von 50°C/5 Zyklen, 55°C/5 Zyklen, 60°C/25 Zyklen). Diese enthielten jeweils als Überhang die Sequenz für die Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Not*I (Sequenzen siehe Anhang). Aufgrund der Verwendung einer Taq-Polymerase verfügte das PCR-Produkt (Abb. 27c) über 3'-Adenin-Überhänge, die für die Ligation in den Klonierungsvektor

pCR2.1 benötigt wurden. Dieser verfügt über komplementäre 3'-Thymidin-Überhänge, was die Ligation des PCR-Produkts ermöglichte (I-II, Abb. 27c).

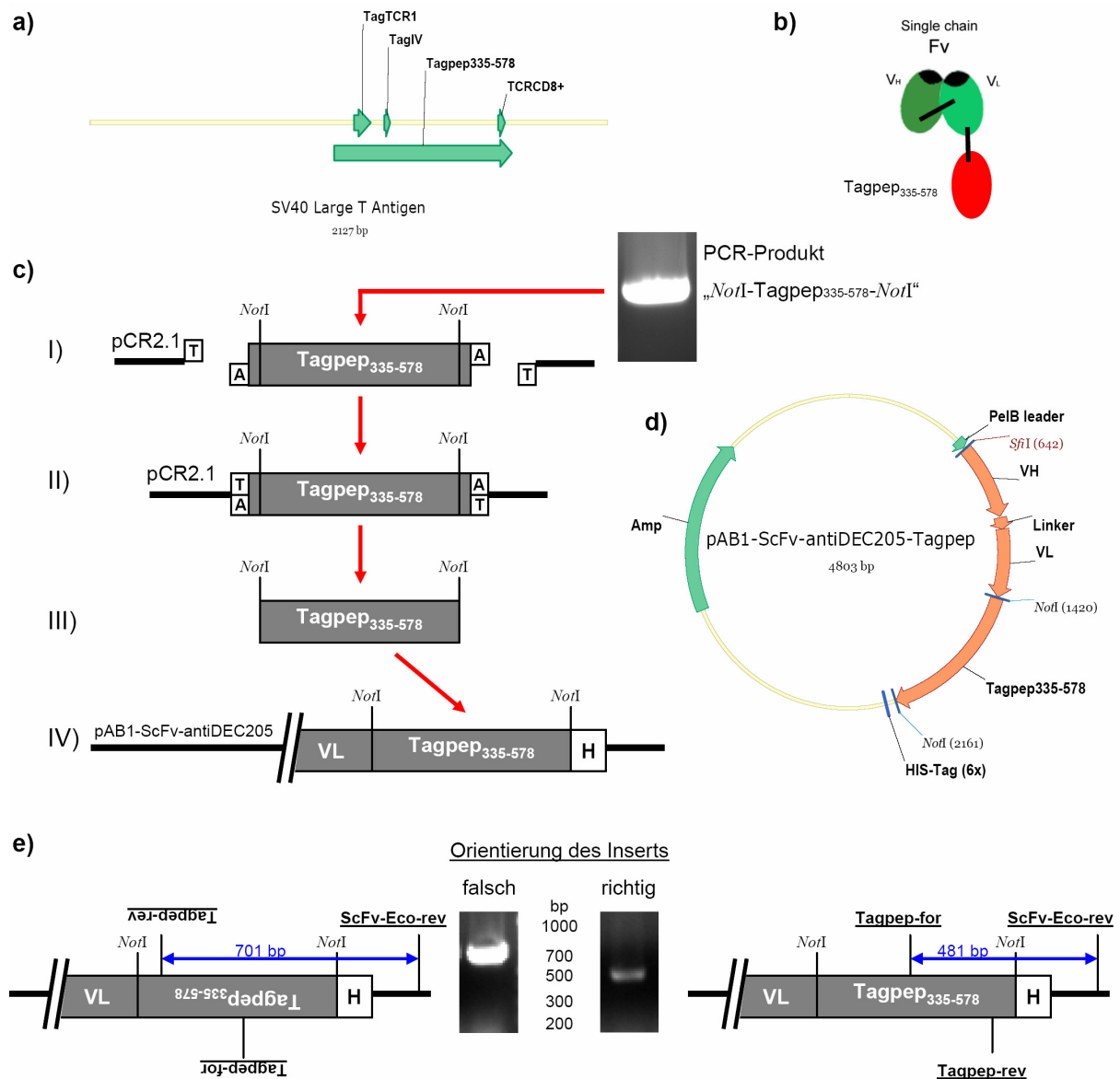


Abbildung 27: Klonierung des Fusionsantikörper-Expressionsplasmides.

a) Das SV40 Large T Antigen-Gen, die für die Klonierung ausgewählte Region (Tagpep₃₃₅₋₅₇₈) und die darin enthaltenen Peptide TagTCR1, TagIV und TCRCD8+. **b)** Schematische Darstellung des anti-DEC205-Tagpep-ScFv mit seinen variablen Regionen V_H und V_L und dem fusionierten Tagpep₃₃₅₋₅₇₈. **c)** Klonierung des Tagpep₃₃₅₋₅₇₈-Inserts in den Klonierungsvektor pCR2.1 über Adeninüberhänge (I-II). Klonierung des Tagpep₃₃₅₋₅₇₈-Inserts in die NotI-Schnittstelle des Expressionsvektors pAB1-ScFv-antiDEC205 (III-IV; H: HIS-Tag). **d)** Plasmidkarte des pAB1-ScFv-anti-DEC205-Tagpep-Expressionsvektors (Amp: Ampicillin-Resistenzgen). **e)** Ermittlung der Orientierung des Inserts. Schematische Darstellung des falsch (links) und des richtig (rechts) eingebauten Inserts und der PCR-Produkte (blaue Pfeile). Mitte: Die PCR-Produkte nach Auftrennung im Agarosegel.

In einem weiteren Schritt wurde die Sequenz für Tagpep₃₃₅₋₅₇₈ mit Hilfe des Restriktionsenzym *NotI* ausgeschnitten und in den zuvor generierten, ebenfalls *NotI*-geschnittenen und dephosphorilierten Expressionsvektor pAB1-ScFv-anti-DEC205 ligiert (III-IV, Abb. 27c).

Da an beiden Enden des Inserts mit dem gleichen Enzym geschnitten wurde, ist ein Einbau des Inserts in beiden Orientierungen möglich. Aus diesem Grund wurden nach der Transformation der Ligation und dem Ausplattieren der Bakterien-suspension auf Ampicillin-Agarplatten am darauf folgenden Tag Klone gepickt und zu verschiedenen PCR-Reaktionen gegeben. Dafür kamen drei verschiedene Primer zu Einsatz, die unterschiedlich kombiniert wurden. Der auf dem Vektor bindende Rückwärtsprimer ScFv-Eco-rev wurde entweder mit dem Primer Tagpep-for oder dem Primer Tagpep-rev kombiniert. Ergab die Kombination aus ScFv-Eco-rev und Tagpep-rev ein PCR-Produkt der Länge 701 bp, wurde im untersuchten Klon das Insert mit falscher Orientierung eingebaut (Abb. 27e, links). Bei einem PCR-Produkt der Länge 481 bp und der Kombination der Primer ScFv-Eco-rev und Tagpep-for wurde das Insert mit richtiger Orientierung eingebaut (Abb. 27e, rechts).

Es konnte eine Vielzahl von Klonen mit Insert falscher Orientierung analysiert werden, jedoch nur zwei Klone mit richtiger Orientierung. Diese zwei Klone sind nach dem Anwachsen auf der Agarplatte sehr schnell abgestorben, während die anderen Klone beliebig expandiert werden konnten. Ein Grund dafür könnte eine Unverträglichkeit der klonierten Sequenz auf Bakterien sein. Dies kam bei der Klonierung des PCR-Produkts in den Klonierungsvektor pCR2.1 nicht zum Tragen, da hier die klonierte Sequenz nicht exprimiert wurde, was nach der Klonierung in den Expressionsvektor jedoch der Fall war.

Die sequenzspezifische Bindung des Primers Tagpep-for ist ein starker Hinweis auf den Einbau des richtigen Inserts. D.h. der in Abbildung 27d) gezeigte Expressionsvektor konnte offensichtlich generiert werden, aber eine Expansion der damit transformierten Bakterien war nicht möglich. Die Verwendung eines anderen Bakterienstammes könnte eventuell Abhilfe schaffen. Eine effiziente Produktion des anti-DEC205-Tagpep-ScFv in Bakterien scheint jedoch nicht möglich zu sein, weshalb nun die Expression des Konstruktes in Säugetierzellen geplant ist.

4 Diskussion

4.1 DC-gerichtete Immunisierung in der anti-Tumorthherapie

Für eine effiziente anti-Tumor-Immuntherapie ist eine gezielte und effektive Aktivierung des Immunsystems notwendig. Prinzipiell hat das Immunsystem unterschiedliche Möglichkeiten eine Immunantwort gegen Tumoren zu initiieren. Zum einen besteht die Möglichkeit einer humoralen Immunantwort, in der die von B-Zellen produzierten Antikörper in Verbindung mit dem Komplementsystem gegen die Tumorzellen vorgehen. Zum anderen gibt es die zelluläre Immunantwort, in der Zellen, wie die Makrophagen, die natürlichen Killerzellen oder die T-Zellen die Tumorzellen angreifen. Die Anwesenheit der Tumorzellen alleine reicht jedoch meist nicht aus, eine Immunantwort zur Abstoßung der Tumoren auszulösen. Grund dafür sind unter anderem die geringe Expression von MHC-Molekülen und von co-stimulatorischen Molekülen^{20, 21} oder die Ausschüttung immunsuppressiver Faktoren durch den Tumor.^{133, 134} Zudem können die in geringer Zahl vorhandenen MHC-Peptid-Komplexe in Kombination mit der Abwesenheit T-Zell co-stimulatorischer Moleküle T-Zelltoleranz erzeugen und das Tumorstadium fördern.^{32, 135}

Das Immunsystem muss deshalb durch gezielte Behandlung tumorspezifisch aktiviert werden, um auf den Tumor aufmerksam zu werden und ihn bekämpfen zu können. Eine zentrale Rolle spielen hierbei zwei T-Zellpopulationen. Die CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen, die die Tumorzellen antigenspezifisch erkennen und töten können und die CD4-positiven T-Helferzellen, die unter anderem Makrophagen und B-Zellen aktivieren. Beide T-Zelltypen bedürfen der antigenspezifischen Aktivierung durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs). Die APCs nehmen Antigene auf und präsentieren diese den T-Zellen, was bei zusätzlicher Aktivierung der T-Zellen zur Expansion der antigenspezifischen T-Zellpopulationen führt. Dabei ist es wichtig, dass die T-Zellen mit für den Tumor spezifischen Antigenen aktiviert werden, denn nur dann expandieren tumorspezifische T-Zellen. Einige dieser sogenannten Tumorantigene sind bekannt, wie z.B. die für das Melanom spezifischen Antigene TRP2, gp100 oder MART-1/Melan-A.

Unter den Antigen-präsentierenden Zellen sind die dendritischen Zellen die effektivsten T-Zell-Aktivatoren,^{85, 86} daher verspricht eine Aktivierung von Tumor-

spezifischen T-Zellen durch dendritische Zellen den größten Erfolg aller zurzeit getesteten zellulären Immuntherapien.

Verschiedene Methoden um Tumorantigene den dendritischen Zellen zuzuführen wurden im Mausmodell bereits entwickelt. Dabei wurde unter anderem die für ein Tumorantigen codierende DNA z.B. über virale Vektoren^{47, 126, 128, 129} verabreicht, um eine anti-Tumorimmunität hervorzurufen. Außerdem wurden Methoden, wie die *ex vivo* Beladung der dendritischen Zellen mit Peptiden oder Tumorlysaten³⁷⁻⁴⁰ oder auch die Injektion tumorspezifischer Antigene¹³⁶ etabliert. Teilweise wurden auch leicht veränderte Antigene verabreicht, so z.B. das humane Homolog eines Tumorantigens, um die Immunantwort zu verstärken.^{47, 126} Hierbei wird das xenogene Antigen zwar als fremd erkannt, was die Immunantwort verstärkt, aber die dadurch aktivierten Zellen können trotzdem das syngene Antigen erkennen.

Viele der genannten Methoden sind zwar im murinen System sehr vielversprechend, doch ihre klinische Anwendung ist oft kompliziert, risikoreich und aufwändig.^{42, 44} Hingegen sind Antikörper-basierende Therapien einfacher zu handhaben, da hier keine Viren oder lebende Zellen injiziert werden, sondern Proteine in Form von Antikörpern. Viele Antikörper-basierende Therapien sind bereits zugelassen oder befinden sich in klinischen Studien. Der humane anti-DEC205-Antikörper,^{137, 138} der für die *in vivo*-Beladung dendritischer Zellen mit Antigenen eingesetzt werden könnte, wurde bereits in humanen *in-vitro*-Studien erfolgreich eingesetzt.¹²² Für den Einsatz in der anti-Tumorthherapie sind jedoch noch zahlreiche Untersuchungen im Tiermodell notwendig, um ein besseres Verständnis der *in vivo*-Wirkung einer solchen Behandlung zu bekommen.

Mit der *in vivo*-Beladung bzw. der DC-gerichteten Immunisierung mittels des anti-DEC205-Antikörpers lassen sich die physiologischen Vorteile der dendritischen Zellen (DC) besonders gut nutzen. Die Konjugate sind bereits eine halbe Stunde nach der Injektion in den sekundären lymphoiden Organen zu finden.⁹¹ Epidermale DCs oder Langerhans Zellen, die Antigene in der Haut aufnehmen, benötigen für die Einwanderung in die sekundären lymphoiden Organe mindestens sechs Stunden. Daher wird vermutet, dass die Konjugate direkt in die sekundären lymphoiden Organe gelangen und dort über die DEC205-Rezeptoren der dendritischen Zellen aufgenommen werden. Die über den DEC205-Rezeptor der dendritischen Zellen aufgenommenen Antigene werden dann bis zu zwei Wochen von den dendritischen

Zellen präsentiert.⁹¹ Dabei ist die DC-vermittelte Antigenpräsentation gegenüber der nicht gerichteten Immunisierung um das 100-fache effektiver.^{91, 117}

Wie in Kapitel 3.1.5.3 gezeigt, werden bei der DC-gerichteten Immunisierung mit anti-DEC205-Konjugaten sowohl CD4-positive T-Helfer-Zellen als auch CD8-positive T-Killer-Zellen aktiviert und zur Proliferation angeregt. Zwar kann die alleinige Aktivierung der CD8-positiven Zellen z.B. bei der Bekämpfung viraler Infektionen ausreichend sein,^{139, 140} jedoch ist für eine langanhaltende Aktivität der CD8-positiven Zellen, wie sie bei einer Tumorbehandlung erwünscht ist, die Hilfe der CD4-positiven Helferzellen notwendig.^{131, 134, 141, 142} Dabei ist es essentiell, dass beide Zellpopulationen zum gleichen Zeitpunkt aktiviert werden.¹⁴³

Bei der Analyse der Proliferation *in vivo* (Kap. 3.1.5.3) war die Proliferation beider T-Zellpopulationen nach DC-gerichteter Immunisierung vergleichbar mit der Proliferation, die nach ungerichteter Immunisierung zu messen war. Jedoch konnte nach DC-gerichteter Immunisierung bei beiden T-Zellpopulationen eine erhöhte Interferon-gamma-Produktion festgestellt werden. Bei den CD4-positiven T-Zellen war die Interferon-gamma-Produktion nach DC-gerichteter Immunisierung gegenüber der Protein- oder Peptid-Immunisierung sogar signifikant erhöht, obwohl teilweise eine um ein vielfaches höhere Menge an Protein oder Peptid verabreicht wurden. Die hohe Interferon-gamma-Produktion der proliferierten CD4-positiven T-Zellen ist für eine potente anti-Tumorimmunität sehr wichtig, denn das von den T-Helferzellen ausgeschüttete Interferon-gamma zieht u.a. die für die Bekämpfung des Tumors wichtigen T-Zellen, Makrophagen und Natürliche Killerzellen an.^{144, 145}

Neben den CD4-positiven T-Zellen spielen auch die CD8-positiven T-Zellen eine wichtige Rolle während einer anti-Tumorimmunantwort. So werden z.B. durch die Ausschüttung des Interferon-gammas nicht nur CD4- und CD8-positive T-Zellen angelockt,¹⁴⁶ sondern das Interferon-gamma fördert auch die klonale Expansion der CD8-positiven T-Zellen.¹⁴⁷ Eine zentrale Funktion der CD8-positiven Zellen ist aber ihre antigenspezifische Killeraktivität, mit der sie die Tumorzellen direkt abtöten. Dieser Prozess kann entweder durch das von den Killerzellen ausgeschüttete Perforin vermittelt werden, was zur Perforierung und zum Platzen der Zielzelle führt, oder die Tumorzellen werden Fas-vermittelt in die Apoptose geführt.^{148, 149}

In *in vivo* Proliferationsversuchen zeigten die proliferierten CD8-positiven T-Zellen nach DC-gerichteter Immunisierung eine nur gering erhöhte Ausschüttung von

Interferon-gamma im Vergleich zu den anderen Immunisierungsmethoden (Abb. 15d, unten rechts). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass in diesem Experiment T-Zellrezeptor-transgene T-Zellen eingesetzt wurden, die sich durch eine vergleichsweise schwache Peptid- oder Proteinimmunisierung leicht aktivieren lassen. Schwieriger ist es sicherlich T-Zellen aus einer natürlichen T-Zellpopulation antigenspezifisch zu aktivieren und zur Proliferation anzuregen, da hier wesentlich weniger T-Zellen den antigenspezifischen T-Zellrezeptor tragen. Die durchgeführten Interferon-gamma-ELISPOT-Versuche basieren auf solchen natürlichen T-Zellpopulationen. Hier ist der Vorteil der DC-gerichteten Immunisierung wesentlich deutlicher sichtbar. Nach anti-DEC205-Tag-Immunisierung konnten, auch bei Tumor-tragenden Mäusen, wesentlich mehr Interferon-gamma-produzierende T-Zellklone identifiziert werden als nach ungerichteter Immunisierung mit Tag-Protein (Abb. 14, 20f und 21g). So konnte gezeigt werden, dass nach DC-gerichteter Immunisierung mit anti-DEC205-Tag sowohl immunkompetente CD4- wie auch CD8-T-Zellen generiert wurden, die aufgrund ihrer hohen Interferon-gamma-Produktion besonders gut für eine Tumorbehandlung geeignet sind.

Das anti-DEC205-Tag-Konjugat wurde dann weiterführend in verschiedenen Tumorexperimenten eingesetzt. Dabei wurden ausschließlich, um einen therapeutischen Versuchsansatz zu verfolgen, bereits etablierte Tumoren behandelt. Zuerst wurde das Konjugat am subkutanen, transplantierbaren RMA-Tag-Tumormodell getestet. Hier konnte, vor allem nach fortlaufender Behandlung mit dem Protein-Konjugat, eine Verzögerung des Tumorwachstums und eine Verlängerung der Überlebensdauer erzielt werden. Das ebenso getestete Peptid-Konjugat erbrachte hingegen nur eine anfängliche Verzögerung des Tumorwachstums. Beim anti-DEC205-TagIV-Peptidkonjugat wurde nur das für MHC I spezifische TagIV-Peptid gekoppelt, jedoch kein für MHC II spezifisches Peptid, wodurch vermutlich primär nur die CD8-positiven T-Zellen antigenspezifisch aktiviert wurden. Diese Daten sind ein weiterer Hinweis dafür, dass für eine nachhaltige anti-Tumorimmunität die Aktivierung beider T-Zellpopulationen essentiell ist.

Des Weiteren wurde das anti-DEC205-Tag-Proteinkonjugat auch am transplantierbaren B16-Tag-Melanommodell getestet. Hier konnte ein sehr guter Effekt erzielt und das Tumorwachstum des sonst sehr schnell wachsenden B16-Tag-Tumors über

einen Zeitraum von zehn Tagen aufgehalten werden, was zudem zu einer deutlichen Verlängerung der Überlebensdauer führte (Abb. 23 f-j).

Diese Ergebnisse belegen, dass mit DC-gerichteter Immunisierung mit Hilfe der anti-DEC205-Konjugate sowohl CD4-positive als auch CD8-positive, immunkompetente T-Zellen antigenspezifisch aktiviert werden konnten. Diese sind aufgrund ihrer hohen Interferon-gamma-Produktion besonders gut für die Erzeugung einer effektiven anti-Tumorimmunität geeignet, was durch die durchgeführten Tumorexperimente verdeutlicht wurde. Die anti-DEC205-Konjugate versprechen ein gutes Werkzeug in der in der Behandlung von Tumoren zu sein.

4.2 Kombination verschiedener Therapien

Neben verschiedenen Immunisierungsmethoden wurden in der Vergangenheit auch andere immunologische Methoden zur Behandlung von Tumoren eingesetzt. So z.B. die Depletion regulatorischer T-Zellen^{150, 151} oder die Aktivierung des Tumorendothels mittels systemischer Gabe von CpG.⁶² In den im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Experimenten sollte untersucht werden, ob sich die genannten Behandlungsmethoden mit der anti-DEC205-Konjugatbehandlung kombinieren lassen und inwieweit Synergieeffekte entstehen.

Regulatorische T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung. Es kommt mitunter zu einer selektiven Akkumulation der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen im Tumor, speziell in fortgeschrittenen Tumoren.¹⁵² Hier wurde die Depletion der regulatorischen T-Zellen mit anti-CD25-Antikörper (PC61) schon mehrfach als Behandlungsmethode in murinen Tumormodellen auch in Kombination mit anderen Behandlungsmethoden eingesetzt.^{150, 151, 153, 154}

Zwar wurden anti-DEC205-Konjugate bereits in Kombination mit der Depletion regulatorischer T-Zellen eingesetzt, eine erfolgreiche Behandlung von Tumoren konnte jedoch noch nicht gezeigt werden.¹⁵⁵ Zu Beginn wurde die Kombinationsbehandlung im subkutanen RMA-Tag-Tumormodell angewendet. Hier konnte zuvor schon eine Verzögerung des Tumorwachstums und die Verlängerung der Überlebensdauer nach anti-DEC205-Tag-Behandlung gezeigt werden (Kap. 3.2.1.4). Bei Anwendung der Kombinationstherapie mit anti-DEC205-Tag-Immunisierung und der Gabe des anti-CD25-Antikörpers konnte bei allen so behandelten Mäusen eine deutliche Verzögerung des Tumorwachstums gegenüber unbehandelten tumortragenden Mäusen erzielt werden. Darüber hinaus hat fast die Hälfte dieser Mäuse den Tumor abgestoßen (Kap. 3.2.1.5). Dieses Ergebnis konnte nur mit der kombinierten Therapie erzielt werden, jedoch nicht mit den jeweils einzeln angewendeten Behandlungsmethoden.

Die Reaktion gegen den Tumor, die sich bei zwei Mäusen gezeigt hat, die ausschließlich mit anti-CD25-Antikörper behandelt wurden, ist eventuell auf die Immunogenität des RMA-Tumors zurückzuführen. Durch die ursprünglich virale Induktion des Tumors werden auch virale Proteine wie z.B. gag oder env von den Tumorzellen exprimiert.¹⁵⁶ Die Depletion alleine könnte hier ausreichen um eine

Immunantwort gegen diese für die Maus körperfremden Proteine hervorzurufen. Die Tatsache, dass nur zwei der so behandelten Mäuse eine Reaktion zeigten und die anderen Mäuse keine Verzögerung im Tumorwachstum aufwiesen, deutet darauf hin, dass es sich um einen eher seltenen Effekt handelt. Hingegen nach zusätzlicher Immunisierung mit anti-DEC205-Tag zeigten alle Mäuse eine deutliche Verzögerung des Tumorwachstums.

Um die Übertragbarkeit dieser Kombinationsbehandlung auf andere Tumormodelle zu überprüfen, wurde diese auch im B16-Tag-Melanommodell angewendet. Doch hier führte die Gabe des anti-CD25-Antikörpers zu einer Beschleunigung des Tumorwachstums. Dies konnte zwar durch die zusätzliche Immunisierung mit anti-DEC205-Tag etwas abgebremst werden, eine Synergie der beiden Methoden konnte jedoch nicht festgestellt werden, da mit der alleinigen Gabe von anti-DEC-205-Tag ein wesentlich besserer Behandlungserfolg erzielt werden konnte (Kap. 3.2.1.6). Zwar wird in verschiedenen Veröffentlichungen über eine Verzögerung des Tumorwachstums und sogar über Abstoßung von Tumoren nach der Gabe von anti-CD25-Antikörper im B16-Modell berichtet,^{150, 151, 154} jedoch wurden hier die Mäuse vor Injektion der Tumorzellen behandelt, was eine präventive, jedoch keine therapeutische Behandlung darstellt. S. Schallenberg hat die präventive und die therapeutische Behandlung B16-tumortragender Mäuse mit anti-CD25-Antikörper untersucht und ebenfalls eine Beschleunigung des Tumorwachstums bei therapeutischer Anwendung beobachtet. Ferner hat sie gezeigt, dass die aktivierten Effektorzellen, die ebenfalls CD25 tragen, durch die Depletion nicht beeinflusst werden (S. Schallenberg, unveröffentlichte Daten). Somit scheint ein eventuelles Ausschalten der Effektorzellen nicht die Ursache für das beschleunigte Tumorwachstum zu sein.

T. Fujimura hat in neuerlichen Versuchen im Ret-Tumormodell (ebenfalls ein transplantierbares Melanom) nach therapeutischer Gabe des anti-CD25-Antikörpers eine erhöhte Anzahl an suppressiven MDSCs („myeloid derived suppressor cells“) in den tumordrainierenden Lymphknoten und im Tumor analysiert (unveröffentlichte Daten). Diese Makrophagensubpopulation¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ könnte durch ihren suppressiven Einfluss für das beschleunigte Tumorwachstum verantwortlich sein. Genauere Untersuchungen sind hier notwendig, um diese Fragen ausreichend klären zu können.

Die unterschiedlichen Behandlungserfolge nach der therapeutischen Depletion der regulatorischen T-Zellen in den Tumormodellen RMA-Tag und B16-Tag könnte durch die sehr unterschiedliche Verteilung der regulatorischen T-Zellen in den verschiedenen Organen der tumortragenden Mäuse begründet sein. Bei den RMA-Tag-tumortragenden Mäusen konnte ein erhöhter Anteil an regulatorischen T-Zellen in den Lymphknoten festgestellt werden, während im Tumor nur sehr wenige dieser Zellen zu finden waren. B16-Tag-tumortragende Mäuse hingegen haben einen normalen Anteil regulatorischer T-Zellen in den Lymphknoten, jedoch einen sehr hohen Anteil an regulatorischen T-Zellen innerhalb der CD4-positiven T-Zellpopulation im Tumor (Kap. 3.2.1.7). Die regulatorischen T-Zellen in den Lymphknoten lassen sich durch den anti-CD25-Antikörper sehr gut reduzieren, der Anteil der sich im B16-Tumor befindlichen regulatorischen T-Zellen jedoch nicht (S. Schallenberg, unveröffentlichte Daten). Möglicherweise sind daher diese tumorständigen regulatorischen T-Zellen für den Schutz des Tumors vor dem Immunsystem mitverantwortlich. Da sie durch die Gabe des anti-CD25-Antikörpers nicht reduziert werden, könnte dies ein Grund für das Ausbleiben eines Behandlungserfolges nach therapeutischer Gabe von anti-CD25 im B16-Tumormodell sein. So hat sich gezeigt, dass die Depletion der regulatorischen T-Zellen nicht in jedem Tumormodell zu einer Verbesserung der Behandlung beiträgt.

In BMT-9-Fibrosarcoma-tragenden Mäusen konnte eine mit dem B16-Melanommodell vergleichbare Verteilung der regulatorischen T-Zellen in den unterschiedlichen Organen analysiert werden (Abb. 24). Auch aus dem Ret-Melanommodell sind ähnliche Zahlen bekannt. Anhand dieser Zahlen könnte untersucht werden, inwieweit die Beobachtungen aus dem B16-Melanommodell auf andere Tumormodelle übertragbar sind und ob es sich dabei um ein B16- oder Melanom-spezifisches Phänomen handelt.

Neben den Versuchen mit Transplantations-Tumormodellen wurden auch Versuche im autochthonen RIP1-Tag5-Tumormodell durchgeführt. In einem ersten Versuchansatz wurden Mäuse, die bereits einen soliden Tumor trugen, mehrfach mit anti-DEC205-Tag immunisiert. Dies hat zu keiner Verlängerung der Überlebenszeit geführt, obwohl in verschiedenen immunologischen Assays im gleichen Mausstamm (C3H) eine sehr gute Immunantwort ausgelöst werden konnte. Im „*in vivo* kill“-Assay (Abb. 13d) und vor allem in *in vivo* Proliferations-Assays (Abb 15) konnte dies

gezeigt werden. Besonders die starke Interferon-gamma-Produktion nach anti-DEC205-Tag-Immunisierung deutet eigentlich auf eine sehr gute Aktivierung des Immunsystems hin (Abb. 15d). Da bei histologischen Untersuchungen tumortragender, anti-DEC205-Tag-immunisierter RIP1-Tag5-Mäuse keine signifikante Infiltration von Effektorzellen in den Tumor festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt), ist davon auszugehen, dass die aktivierten Effektorzellen bei der Infiltration des Tumors behindert wurden.

Die Tumorentstehung im RIP1-Tag5-Tumormodell ist sehr gut untersucht. So kommt es bereits vor der Etablierung des Tumors zu einer Veränderung in der Angiogenese dem sogenannten „Angiogenic Switch“, einem unkontrollierten, chaotischen Wachstum von Blutgefäßen in der Umgebung des entstehenden Tumors. Die ungewöhnlich hohe Expression des RGS-5 („regulator of G-protein signaling-5“) in den Perizyten fördert hier die Neubildung von Blutgefäßen in der frühen Phase der Tumorentstehung.¹⁶⁰ Die Veränderungen der Blutgefäße verhindert möglicherweise die Infiltration der Effektorzellen. Die systemische Gabe von CpG führt zu einer Normalisierung der Angiogenese und fördert so die Infiltration von Effektorzellen in den Tumor.⁶² Aus diesem Grund wurde eine Kombinationstherapie von systemischer Gabe von CpG und der Immunisierung mit anti-DEC205-Tag angewendet. Obwohl diese Behandlung nur über einen begrenzten Zeitraum nach Entstehen des Tumors angewendet wurde, konnte die Überlebenszeit deutlich verlängert werden (Kap. 3.2.2). Hierbei war die DC-gerichtete Immunisierung ein wesentlicher Bestandteil der Behandlung, denn die Immunisierung mit nicht konjugiertem Tag-Protein erbrachte trotz zusätzlicher systemischer Gabe von CpG keine Verlängerung der Überlebensdauer. So konnte gezeigt werden, dass die Synergie von DC-gerichteter Immunisierung und systemischer Gabe von CpG für die Behandlung tumortragender RIP1-Tag5-Mäuse essentiell ist.

In allen drei angewendeten Tumormodellen, den Transplantations-Tumormodellen RMA-Tag und B16-Tag und dem autochthonen Tumormodell RIP1-Tag5, konnte die Wirkung der DC-gerichteten Immunisierung mit anti-DEC205-Tag-Konjugaten gezeigt werden. Dabei wurden keine Nebenwirkungen oder das Tumorstadium fördernde Effekte festgestellt. Mit der Depletion der regulatorischen T-Zellen konnten zwar im RMA-Tag-Tumormodell Erfolge erzielt werden, im B16-Tag-Tumormodell hingegen führte die Depletion zu einem beschleunigten Tumorstadium. Somit ist

eine sinnvolle Anwendung der Depletion der regulatorischen T-Zellen in der Tumorbehandlung stark eingeschränkt.

Auch über die systemische Gabe von CpG wird von der Ausbildung von Toleranz in der Milz berichtet,¹⁶¹ was für die Anwendung in der anti-Tumorthérapie hinderlich sein könnte. Zwar werden anti-DEC205-Konjugate auch gezielt zur Induktion von Toleranz eingesetzt, jedoch ist dieser Effekt durch die Aktivierung und Reifung der dendritischen Zellen leicht umkehrbar. Dies macht die Anwendung der anti-DEC205-Konjugate zu einem universellen Werkzeug in der anti-Tumorthérapie.

4.3 Konjugate und Fusionsantikörper

Für den Transport des Tumorantigens Large T Antigen (Tag-Protein) zu den dendritischen Zellen *in vivo* war die chemische Kopplung des Tag-Proteins an den anti-DEC205-Antikörper notwendig. In der Vergangenheit wurden schon mehrfach Antigene, wie z.B. Ovalbumin⁹¹ oder TRP2,⁵⁶ an den anti-DEC205-Antikörper chemisch gekoppelt. Die dabei angewendete Kopplungsmethode setzte voraus, dass primäre Amine, jedoch keine reduzierten Sulfhydryl-Gruppen in dem zu koppelnden Protein vorhanden bzw. für die Kopplungsreagenz zugänglich sind. Diese zuvor angewendeten Methoden konnten aufgrund des Vorhandenseins von reaktiven Aminen und Sulfhydryl-Gruppen im Tag-Protein nicht angewendet werden. Die Zugabe des Crosslinkers zum Tag-Protein führte zum sofortigen Ausfall des Proteins. Dabei hat der zugegebene Crosslinker sowohl mit den Aminen als auch mit den Sulfhydryl-Gruppen reagiert, was zu einer starken Vernetzung und Bildung großer, unlöslicher Proteinkomplexe führte. Eine neue Methode musste deshalb etabliert werden.

Bei der Etablierung der neuen Kopplungsmethode standen neben dem Erzielen einer hohen Kopplungseffizienz zwei weitere Faktoren im Vordergrund. Zum einen sollte die Bindungsfähigkeit des anti-DEC205-Antikörpers durch die Kopplung nicht beeinflusst werden, zum anderen sollte der Verlust des eingesetzten Tag-Proteins möglichst gering bleiben. Es wurden drei verschiedene Methoden getestet, wobei sich nur eine als besonders geeignet herausgestellt hat. Die beiden anderen Methoden wurden dementsprechend nicht weiter optimiert.

Bei der ersten Methode wurde der Crosslinker MPBH („4(4-N-maleimidophenyl) butyric acid hydracide*HCl*1/2 dioxane“) verwendet, der zuvor schon zur Kopplung von Enzymen an lösliches CD4¹⁶² und Immunglobuline¹⁶³ erfolgreich angewendet wurde. Dabei wurde jeweils das Protein über seine Sulfhydryl-Gruppen mittels des Crosslinkers an eine Glykosilierung des CD4-Rezeptors bzw. Antikörpers gekoppelt. Dies hat den Vorteil, dass durch die spezifische Bindung an die sich im Fc-Teil des Antikörpers befindliche Glykosilierung die variablen Regionen des Antikörpers unbeeinflusst bleiben. Trotz Variation verschiedener Parameter konnte hier jedoch keine effiziente Kopplung durchgeführt werden (Kap. 3.1.1).

Eine andere zuvor beschriebene Methode unter Verwendung des Crosslinkers Sulfo-SMCC („Sulfosuccinimidyl 4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate“)^{56, 91} hat den Vorteil, dass das Protein an die Sulfhydryl-Gruppen am Fc-Teil des Antikörpers gekoppelt wird und somit die variablen Regionen des Antikörpers unbeeinflusst bleiben. Hierzu muss der Antikörper zuvor durch partielle Reduktion in zwei „single chains“ geteilt werden, was durch die Auftrennung der Disulfidbrücke zwischen den beiden schweren Ketten des Antikörpers geschieht. An die so entstandenen Sulfhydryl-Gruppen kann dann das Protein über den zuvor an das Protein gebundenen Crosslinker gekoppelt werden. Die Bindung des Crosslinkers an das Protein setzt das Vorhandensein von primären Aminen aber die Abwesenheit reduzierter Sulfhydryl-Gruppen voraus. Basierend auf dieser Methode wurden die im Tag-Protein bzw. der beta-Galactosidase vorhandenen Sulfhydryl-Gruppen mit *N*-Ethylmaleimid blockiert, um ein Ausfallen des Proteins zu verhindern. Dafür war ein zusätzlicher Aufreinigungsschritt notwendig, was jedoch zu einem starken Verlust von Protein geführt hat (Kap. 3.1.2). Deshalb wurde auch diese Methode nicht weiter optimiert.

Die dritte, im Folgenden dargestellte Methode hat sich gegenüber den schon beschriebenen Methoden durchgesetzt. Bei dieser Kopplung reagiert der Crosslinker zuerst mit den Aminogruppen des Antikörpers, um dann in einer zweiten Reaktion an die Sulfhydryl-Gruppen des Proteins gekoppelt zu werden. Mit dieser Methode konnte eine effiziente Kopplung mit geringem Verlust an Tag-Protein erzielt werden (Kap. 3.1.3). Bei dieser Methode ist eine Kopplung des Proteins in jeder Region des Antikörpers möglich, in der primäre Amine in den Seitenketten der Aminosäuren vorhanden sind, also auch in der variablen Bindungsregion des Antikörpers. Dabei könnte die Bindungsfähigkeit des Antikörpers eingeschränkt werden.

Die Bindungsversuche auf Lymphknoten- und Milzzellen *in vitro* (Kap. 3.1.4.1) und Lymphknotenschnitten (Kap. 3.1.4.2) haben jedoch gezeigt, dass die Bindungsfähigkeit der Protein-Konjugate im Vergleich zum ungekoppelten Antikörper nicht weiter beeinflusst wird. Die bei den Bindungsversuchen gemessene geringere Fluoreszenzintensität der hergestellten Peptid-Konjugate könnte eventuell auf eine schlechtere Bindung des FITC-markierten Sekundärantikörpers zurückzuführen sein. Durch die Bindung einer Vielzahl der Peptide an den Antikörper (Kap. 3.1.3.2) könnte die Struktur des Antikörpers so verändert sein, dass sie vom Sekundärantikörper

nicht mehr effizient erkannt werden konnte (Kap. 3.1.4). Somit konnte eine Kopplungsmethode etabliert werden, mit der unter geringem Verlust an Tag-Protein dieses effizient an den Antikörper gekoppelt wurde, ohne die Bindungsfähigkeit des Antikörpers maßgeblich zu beeinflussen.

Neben der nahezu uneingeschränkten Bindungsfähigkeit der Protein-Konjugate konnte des Weiteren die Immunogenität der Protein-Konjugate in mehreren immunologischen Assays gezeigt werden. In *in vivo* „kill assays“ (Kap. 3.1.5.1) und vor allem in ELISPOT-Assays (Kap.3.1.5.2) und in *in vivo* Proliferations-Assays (Kap. 3.1.5.3) zeigten die Protein-Konjugate teilweise eine wesentlich bessere Funktion als das ungekoppelte Protein. So konnte gezeigt werden, dass bezüglich der Bindung und der Funktionalität sehr gute anti-DEC205-Tag-Protein-Konjugate hergestellt wurden. Diese konnte dann in den darauffolgenden Tumorexperimenten eingesetzt werden.

Wie gezeigt sind die chemisch gekoppelten Konjugate funktionell sehr gut, haben jedoch den Nachteil, dass sie unter hohem Aufwand hergestellt werden müssen. Das Protein und der Antikörper müssen jeweils exprimiert und unter hohem experimentellen Aufwand aufgereinigt werden. Hinzu kommt der Kopplungsprozess, bei dem ein gewisser Produktverlust der aufwändig hergestellten Proteine und Antikörper nicht vermeidbar ist. Aus diesen Gründen wurde ein Fusionsantikörper etabliert. Dabei handelt es sich um einen sogenannten „Single chain Fragment variable“ (ScFv), der Bindungsregion einer schweren und leichten Kette. Dieser ScFv kann mit einem Antigen durch Klonierung fusioniert werden. Für die Herstellung eines gewünschten Fusionsantikörpers muss lediglich die für das entsprechende Antigen codierende cDNA in den zuvor hergestellten ScFv-Expressionsvektor subkloniert werden. Anschließend kann bereits mit der bakteriellen Expression des Fusionsantikörpers begonnen werden.

Zwar ist die Herstellung des ScFv-Expressionsvektors mit Aufwand verbunden, ist dieser jedoch einmal etabliert, können einzelne Peptide oder Epitope, Proteindomänen oder ganze Proteine beliebig subkloniert werden. Für die Tumor-Antigene gp100 und TRP2 sowie für das MOG-Peptid, das für das EAE-Mausmodell, einem induzierbaren Modell für Multiple Sklerose benötigt wird, konnten in unserer Arbeitsgruppe bereits Fusionsantikörper hergestellt und funktionell erfolgreich getestet werden. Für das Tag-Protein wurde mehrfach versucht, einen Teil des

Proteins, in dem alle wichtigen Epitope des Proteins enthalten sind, in den ScFv-Expressionsvektor zu klonieren. Doch sobald das Insert richtig eingebaut war, starben die Bakterien ab (Kap. 3.3.2). Dies könnte auf eine eventuelle Unverträglichkeit des Tag-Proteins für Bakterien hindeuten. Deshalb ist die Expression dieses Konstrukts mit Hilfe einer Säugetierzelllinie geplant, zumal die Codons der Tag-Sequenz für die Expression in Säugetierzellen optimiert sind. D.h. die Basentriplets der DNA-Sequenz codieren für in Säugetierzellen häufig vorkommende tRNAs, die wiederum in Bakterien seltener vorkommen.

Abschließend kann gesagt werden, dass durch die chemische Kopplung anti-DEC205-Tag-Konjugate hergestellt wurden, die in zahlreichen Immunisierungs- und Tumorexperimenten erfolgreich eingesetzt werden konnten. Darüber hinaus konnte ein Expressionssystem zur Herstellung von Fusionsantikörpern etabliert werden, das im Falle des Tag-Proteins als Fusionsprotein noch optimiert werden muss.

4.4 Schlussfolgerung

In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass die DC-gerichtete Immunisierung mit den hergestellten anti-DEC205-Tag-Konjugaten eine starke, antigenspezifische Immunantwort induziert. Ferner konnte eine hohe Interferon-gamma-Produktion in den Effektor-T-Zellen festgestellt werden, die für die Erzeugung einer starken anti-Tumorimmunität wichtig ist. In den Transplantations-Tumormodellen RMA-Tag und B16-Tag konnte nach therapeutischer Behandlung mit anti-DEC205-Tag-Konjugaten eine Verzögerung des Tumorwachstums erreicht werden und darüber hinaus konnte im RMA-Tag-Tumormodell durch die Synergie mit der Depletion der regulatorischen T-Zellen eine Abstoßung der Tumoren in über 40% der Mäuse erzielt werden. Auch im autochthonen Tumormodell RIP1-Tag5 konnte durch die gleichzeitige systemische Gabe von CpG eine deutliche Verlängerung der Überlebenszeit erreicht werden, die nur mit DC-gerichteter Immunisierung erzielt werden konnte.

Das Ausbleiben der Tumordinfiltration von Effektorzellen nach alleiniger Gabe von anti-DEC205-Konjugaten im autochthonen RIP1-Tag5-Tumormodell, sowie die Ergebnisse aus den Versuchen der therapeutischen Depletion der regulatorischen T-Zellen im B16-Tag-Tumormodell haben gezeigt, dass die Umgebung des Tumors sowie die Beschaffenheit des Tumors selbst eine wichtige Rolle in der Behandlung spielen. So ist für eine wirkungsvolle Tumor-Immuntherapie neben einer effektiven, tumorspezifischen Aktivierung des Immunsystems das „Öffnen“ des Tumors für die aktivierten Effektorzellen essentiell. Dies kann nur durch eine gezielte Kombinationstherapie erreicht werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit der DC-gerichteten Immunisierung mit anti-DEC205-Konjugaten eine nachhaltige anti-Tumorimmunität generiert werden konnte, die durch weitere, ergänzende Maßnahmen, wie der Depletion der regulatorischen T-Zellen oder der systemischen Gabe von CpG, zu einer weiteren Verbesserung der Behandlung führte. Dies macht diese Konjugate zu einem universell einsetzbaren Werkzeug in der Tumor-Immuntherapie.

5 Anhang

Primersequenzen:

moVHForXho:

5'-TGG TCC ACT CGA GAC GGT CGT GGT CCC TTG GCC CC-3'
XhoI

moVHBack Sfi:

5'-CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC SAG GTS MAR CTG VWR SAR TCW GG-3'

moVHBack Sfi2:

5'-CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAT GTC AAS YTT SAR GWG TCW GG-3'
SfiI

moJkForNot1:

5'-TCA TTC TGC GGC CGC CCG TTT SAK YTC CAG CTT GGT SCC-3'

moJkForNot2:

5'-TCA TTC TGC GGC CGC CCG TTT TAT TTC CAR CTT KGT CCC-3'
NotI

moVkBackApaL1:

5'-GGC GGT AGT GCA CAG ATT GTG ATR ACM CAR GAT GAA CTC TC-3'

moVkBackApaL2:

5'-GGC GGT AGT GCA CAG ATT WTG MTG ACC CAA WCT CCA CTC TC-3'

moVkBackApaL3:

5'-GGC GGT AGT GCA CAG ATT GTK CTC ACY CAR TCT CCA GCA AT-3'
ApaLI

Tagpep-NotI-for:

5'-GCG GCC GCT ACC ATA TGC CAA CAG GCT GTT-3'

Tagpep-NotI-rev:

5'-GCG GCC GCC ATA AGA AGC AAA GCA ATG CCA C-3'
NotI

Tagpep-for:

5'-ATT TGC CCT TGG ACA GGC TGA AC-3'

Tagpep-rev:

5'-GGC ACA CTG TAC TCA TTC ATG GTG AC-3'

ScFv-Eco-rev:

5'-GAC GGC CAG TGA ATT CTT ATT AAT GG-3'

6 Literaturverzeichnis

- 1 Chin, L., Garraway, L.A. and Fisher, D.E. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era, *Genes Dev.*, 20: 2149-2182, 2006.
- 2 Huang, X., Soong, S., McCarthy, W.H., Urist, M.M. and Balch, C.M. Classification of localized melanoma by the exponential survival trees method, *Cancer.*, 79: 1122-1128, 1997.
- 3 Leiter, U., Buettner, P.G., Eigentler, T.K. and Garbe, C. Prognostic factors of thin cutaneous melanoma: an analysis of the central malignant melanoma registry of the german dermatological society, *J.Clin.Oncol.*, 22: 3660-3667, 2004.
- 4 Frank, N.Y., Margaryan, A., Huang, Y., Schatton, T., Waaga-Gasser, A.M., Gasser, M., Sayegh, M.H., Sadee, W. and Frank, M.H. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma, *Cancer Res.*, 65: 4320-4333, 2005.
- 5 Schatton, T., Murphy, G.F., Frank, N.Y., Yamaura, K., Waaga-Gasser, A.M., Gasser, M., Zhan, Q., Jordan, S., Duncan, L.M., Weishaupt, C., Fuhlbrigge, R.C., Kupper, T.S., Sayegh, M.H. and Frank, M.H. Identification of cells initiating human melanomas, *Nature.*, 451: 345-349, 2008.
- 6 Ragaz, J., Jackson, S.M., Le, N., Plenderleith, I.H., Spinelli, J.J., Basco, V.E., Wilson, K.S., Knowling, M.A., Coppin, C.M., Paradis, M., Coldman, A.J. and Olivetto, I.A. Adjuvant radiotherapy and chemotherapy in node-positive premenopausal women with breast cancer, *N.Engl.J.Med.*, 337: 956-962, 1997.
- 7 Overgaard, M., Hansen, P.S., Overgaard, J., Rose, C., Andersson, M., Bach, F., Kjaer, M., Gadeberg, C.C., Mouridsen, H.T., Jensen, M.B. and Zedeler, K. Postoperative radiotherapy in high-risk premenopausal women with breast cancer who receive adjuvant chemotherapy. Danish Breast Cancer Cooperative Group 82b Trial, *N.Engl.J.Med.*, 337: 949-955, 1997.
- 8 Ballo, M.T., Ross, M.I., Cormier, J.N., Myers, J.N., Lee, J.E., Gershenwald, J.E., Hwu, P. and Zagars, G.K. Combined-modality therapy for patients with regional nodal metastases from melanoma, *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, 64: 106-113, 2006.
- 9 Dawood, S., Broglio, K., Gong, Y., Yang, W.T., Cristofanilli, M., Kau, S.W., Meric-Bernstam, F., Buchholz, T.A., Hortobagyi, G.N. and Gonzalez-Angulo, A.M. Prognostic significance of HER-2 status in women with inflammatory breast cancer, *Cancer.*, :2008.
- 10 Borg, A., Tandon, A.K., Sigurdsson, H., Clark, G.M., Ferno, M., Fuqua, S.A., Killander, D. and McGuire, W.L. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer, *Cancer Res.*, 50: 4332-4337, 1990.
- 11 Dawood, S., Broglio, K., Esteva, F.J., Ibrahim, N.K., Kau, S.W., Islam, R., Aldape, K.D., Yu, T.K., Hortobagyi, G.N. and Gonzalez-Angulo, A.M. Defining prognosis for women with breast cancer and CNS metastases by HER2 status, *Ann.Oncol.*, :2008.
- 12 Burstein, H.J., Keshaviah, A., Baron, A.D., Hart, R.D., Lambert-Falls, R., Marcom, P.K., Gelman, R. and Winer, E.P. Trastuzumab plus vinorelbine or taxane chemotherapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer: the trastuzumab and vinorelbine or taxane study, *Cancer.*, 110: 965-972, 2007.
- 13 Fanale, M.A. and Younes, A. Monoclonal antibodies in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma, *Drugs.*, 67: 333-350, 2007.

- 14 Marcus,R. and Hagenbeek,A. The therapeutic use of rituximab in non-Hodgkin's lymphoma, *Eur.J.Haematol.Suppl.*, 5-14, 2007.
- 15 Kane,R.C., Farrell,A.T., Saber,H., Tang,S., Williams,G., Jee,J.M., Liang,C., Booth,B., Chidambaram,N., Morse,D., Sridhara,R., Garvey,P., Justice,R. and Pazdur,R. Sorafenib for the treatment of advanced renal cell carcinoma, *Clin.Cancer Res.*, 12: 7271-7278, 2006.
- 16 Zhu,A.X., Holalkere,N.S., Muzikansky,A., Horgan,K. and Sahani,D.V. Early antiangiogenic activity of bevacizumab evaluated by computed tomography perfusion scan in patients with advanced hepatocellular carcinoma, *Oncologist.*, 13: 120-125, 2008.
- 17 Bokstein,F., Shpigel,S. and Blumenthal,D.T. Treatment with bevacizumab and irinotecan for recurrent high-grade glial tumors, *Cancer.*, ..2008.
- 18 Yokoyama,W.M. Immunology: catch us if you can, *Nature.*, 419: 679-680, 2002.
- 19 Groh,V., Wu,J., Yee,C. and Spies,T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation, *Nature.*, 419: 734-738, 2002.
- 20 Restifo,N.P., Esquivel,F., Kawakami,Y., Yewdell,J.W., Mule,J.J., Rosenberg,S.A. and Bennink,J.R. Identification of human cancers deficient in antigen processing, *J.Exp.Med.*, 177: 265-272, 1993.
- 21 Seliger,B., Harders,C., Lohmann,S., Momburg,F., Urlinger,S., Tampe,R. and Huber,C. Down-regulation of the MHC class I antigen-processing machinery after oncogenic transformation of murine fibroblasts, *Eur.J.Immunol.*, 28: 122-133, 1998.
- 22 Hammerling,G.J. and Ganss,R. Vascular integration of endothelial progenitors during multistep tumor progression, *Cell Cycle.*, 5: 509-511, 2006.
- 23 Hargadon,K.M., Brinkman,C.C., Sheasley-O'Neill,S.L., Nichols,L.A., Bullock,T.N. and Engelhard,V.H. Incomplete differentiation of antigen-specific CD8 T cells in tumor-draining lymph nodes, *J.Immunol.*, 177: 6081-6090, 2006.
- 24 Koneru,M., Monu,N., Schaer,D., Barletta,J. and Frey,A.B. Defective adhesion in tumor infiltrating CD8+ T cells, *J.Immunol.*, 176: 6103-6111, 2006.
- 25 Strand,S., Hofmann,W.J., Hug,H., Muller,M., Otto,G., Strand,D., Mariani,S.M., Stremmel,W., Krammer,P.H. and Galle,P.R. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion?, *Nat.Med.*, 2: 1361-1366, 1996.
- 26 Zheng,X., Koropatnick,J., Li,M., Zhang,X., Ling,F., Ren,X., Hao,X., Sun,H., Vladau,C., Franek,J.A., Feng,B., Urquhart,B.L., Zhong,R., Freeman,D.J., Garcia,B. and Min,W.P. Reinstalling antitumor immunity by inhibiting tumor-derived immunosuppressive molecule IDO through RNA interference, *J.Immunol.*, 177: 5639-5646, 2006.
- 27 Ghiringhelli,F., Puig,P.E., Roux,S., Parcellier,A., Schmitt,E., Solary,E., Kroemer,G., Martin,F., Chauffert,B. and Zitvogel,L. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation, *J.Exp.Med.*, 202: 919-929, 2005.
- 28 Liyanage,U.K., Moore,T.T., Joo,H.G., Tanaka,Y., Herrmann,V., Doherty,G., Drebin,J.A., Strasberg,S.M., Eberlein,T.J., Goedegebuure,P.S. and Linehan,D.C. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma, *J.Immunol.*, 169: 2756-2761, 2002.
- 29 Chaput,N., Darrasse-Jeze,G., Bergot,A.S., Cordier,C., Ngo-Abdalla,S., Klatzmann,D. and Azogui,O. Regulatory T cells prevent CD8 T cell maturation by inhibiting CD4 Th cells at tumor sites, *J.Immunol.*, 179: 4969-4978, 2007.

- 30 Fu,J., Xu,D., Liu,Z., Shi,M., Zhao,P., Fu,B., Zhang,Z., Yang,H., Zhang,H., Zhou,C., Yao,J., Jin,L., Wang,H., Yang,Y., Fu,Y.X. and Wang,F.S. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients, *Gastroenterology.*, 132: 2328-2339, 2007.
- 31 Jarnicki,A.G., Lysaght,J., Todryk,S. and Mills,K.H. Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF-beta-producing T cells infiltrating the growing tumor: influence of tumor environment on the induction of CD4+ and CD8+ regulatory T cells, *J.Immunol.*, 177: 896-904, 2006.
- 32 Woo,E.Y., Yeh,H., Chu,C.S., Schlienger,K., Carroll,R.G., Riley,J.L., Kaiser,L.R. and June,C.H. Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation, *J.Immunol.*, 168: 4272-4276, 2002.
- 33 Yang,Z.Z., Novak,A.J., Stenson,M.J., Witzig,T.E. and Ansell,S.M. Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma, *Blood.*, 107: 3639-3646, 2006.
- 34 Yang,Z.Z., Novak,A.J., Ziesmer,S.C., Witzig,T.E. and Ansell,S.M. Attenuation of CD8(+) T-cell function by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma, *Cancer Res.*, 66: 10145-10152, 2006.
- 35 Ghiringhelli,F., Menard,C., Terme,M., Flament,C., Taieb,J., Chaput,N., Puig,P.E., Novault,S., Escudier,B., Vivier,E., Lecesne,A., Robert,C., Blay,J.Y., Bernard,J., Caillat-Zucman,S., Freitas,A., Tursz,T., Wagner-Ballon,O., Capron,C., Vainchenker,W., Martin,F. and Zitvogel,L. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner, *J.Exp.Med.*, 202: 1075-1085, 2005.
- 36 Mahnke,K., Ring,S., Johnson,T.S., Schallenberg,S., Schonfeld,K., Storn,V., Bedke,T. and Enk,A.H. Induction of immunosuppressive functions of dendritic cells in vivo by CD4+CD25+ regulatory T cells: role of B7-H3 expression and antigen presentation, *Eur.J.Immunol.*, 37: 2117-2126, 2007.
- 37 Banchereau,J., Palucka,A.K., Dhodapkar,M., Burkeholder,S., Taquet,N., Rolland,A., Taquet,S., Coquery,S., Wittkowski,K.M., Bhardwaj,N., Pineiro,L., Steinman,R. and Fay,J. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine, *Cancer Res.*, 61: 6451-6458, 2001.
- 38 Dhodapkar,M.V., Steinman,R.M., Sapp,M., Desai,H., Fossella,C., Krasovsky,J., Donahoe,S.M., Dunbar,P.R., Cerundolo,V., Nixon,D.F. and Bhardwaj,N. Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells, *J.Clin.Invest.*, 104: 173-180, 1999.
- 39 Jonuleit,H., Giesecke-Tuettenberg,A., Tuting,T., Thurner-Schuler,B., Stuge,T.B., Paragnik,L., Kandemir,A., Lee,P.P., Schuler,G., Knop,J. and Enk,A.H. A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection, *Int.J.Cancer.*, 93: 243-251, 2001.
- 40 Tuettenberg,A., Becker,C., Huter,E., Knop,J., Enk,A.H. and Jonuleit,H. Induction of strong and persistent MelanA/MART-1-specific immune responses by adjuvant dendritic cell-based vaccination of stage II melanoma patients, *Int.J.Cancer.*, 118: 2617-2627, 2006.
- 41 Nestle,F.O., Alijagic,S., Gilliet,M., Sun,Y., Grabbe,S., Dummer,R., Burg,G. and Schadendorf,D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells, *Nat.Med.*, 4: 328-332, 1998.
- 42 Onaitis,M., Kalady,M.F., Pruitt,S. and Tyler,D.S. Dendritic cell gene therapy, *Surg.Oncol.Clin.N.Am.*, 11: 645-660, 2002.

- 43 Schadendorf,D., Ugurel,S., Schuler-Thurner,B., Nestle,F.O., Enk,A., Brocker,E.B., Grabbe,S., Rittgen,W., Edler,L., Sucker,A., Zimpfer-Rechner,C., Berger,T., Kamarashev,J., Burg,G., Jonuleit,H., Tuttonberg,A., Becker,J.C., Keikavoussi,P., Kampgen,E. and Schuler,G. Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG, *Ann.Oncol.*, 17: 563-570, 2006.
- 44 De,V., I, Krooshoop,D.J., Scharenborg,N.M., Lesterhuis,W.J., Diepstra,J.H., Van Muijen,G.N., Strijk,S.P., Ruers,T.J., Boerman,O.C., Oyen,W.J., Adema,G.J., Punt,C.J. and Figdor,C.G. Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state, *Cancer Res.*, 63: 12-17, 2003.
- 45 Nishikawa,H., Kato,T., Tawara,I., Takemitsu,T., Saito,K., Wang,L., Ikarashi,Y., Wakasugi,H., Nakayama,T., Taniguchi,M., Kuribayashi,K., Old,L.J. and Shiku,H. Accelerated chemically induced tumor development mediated by CD4+CD25+ regulatory T cells in wild-type hosts, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 102: 9253-9257, 2005.
- 46 Willimsky,G. and Blankenstein,T. Interleukin-7/B7.1-encoding adenoviruses induce rejection of transplanted but not nontransplanted tumors, *Cancer Res.*, 60: 685-692, 2000.
- 47 Tormo,D., Ferrer,A., Bosch,P., Gaffal,E., Basner-Tschakarjan,E., Wenzel,J. and Tuting,T. Therapeutic efficacy of antigen-specific vaccination and toll-like receptor stimulation against established transplanted and autochthonous melanoma in mice, *Cancer Res.*, 66: 5427-5435, 2006.
- 48 Hacker,E., Muller,H.K., Irwin,N., Gabrielli,B., Lincoln,D., Pavey,S., Powell,M.B., Malumbres,M., Barbacid,M., Hayward,N. and Walker,G. Spontaneous and UV radiation-induced multiple metastatic melanomas in Cdk4R24C/R24C/TPras mice, *Cancer Res.*, 66: 2946-2952, 2006.
- 49 Tormo,D., Ferrer,A., Gaffal,E., Wenzel,J., Basner-Tschakarjan,E., Steitz,J., Heukamp,L.C., Gutgemann,I., Buettner,R., Malumbres,M., Barbacid,M., Merlino,G. and Tuting,T. Rapid growth of invasive metastatic melanoma in carcinogen-treated hepatocyte growth factor/scatter factor-transgenic mice carrying an oncogenic CDK4 mutation, *Am.J.Pathol.*, 169: 665-672, 2006.
- 50 Willimsky,G. and Blankenstein,T. Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance, *Nature.*, 437: 141-146, 2005.
- 51 Hanahan,D. Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes, *Nature.*, 315: 115-122, 1985.
- 52 Nanni,P., Nicoletti,G., De,G.C., Landuzzi,L., Di,C.E., Cavallo,F., Pupa,S.M., Rossi,I., Colombo,M.P., Ricci,C., Astolfi,A., Musiani,P., Forni,G. and Lollini,P.L. Combined allogeneic tumor cell vaccination and systemic interleukin 12 prevents mammary carcinogenesis in HER-2/neu transgenic mice, *J.Exp.Med.*, 194: 1195-1205, 2001.
- 53 Schell,T.D., Knowles,B.B. and Tevethia,S.S. Sequential loss of cytotoxic T lymphocyte responses to simian virus 40 large T antigen epitopes in T antigen transgenic mice developing osteosarcomas, *Cancer Res.*, 60: 3002-3012, 2000.
- 54 Karre,K., Ljunggren,H.G., Piontek,G. and Kiessling,R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy, *Nature.*, 319: 675-678, 1986.
- 55 Ljunggren,H.G. and Karre,K. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism, *J.Exp.Med.*, 162: 1745-1759, 1985.

- 56 Mahnke,K., Qian,Y., Fondel,S., Brueck,J., Becker,C. and Enk,A.H. Targeting of antigens to activated dendritic cells in vivo cures metastatic melanoma in mice, *Cancer Res.*, **65**: 7007-7012, 2005.
- 57 Ganss,R., Arnold,B. and Hammerling,G.J. Mini-review: overcoming tumor-intrinsic resistance to immune effector function, *Eur.J.Immunol.*, **34**: 2635-2641, 2004.
- 58 Ganss,R. and Hanahan,D. Tumor microenvironment can restrict the effectiveness of activated antitumor lymphocytes, *Cancer Res.*, **58**: 4673-4681, 1998.
- 59 Hager,J.H., Hodgson,J.G., Fridlyand,J., Hariono,S., Gray,J.W. and Hanahan,D. Oncogene expression and genetic background influence the frequency of DNA copy number abnormalities in mouse pancreatic islet cell carcinomas, *Cancer Res.*, **64**: 2406-2410, 2004.
- 60 Mylin,L.M., Deckhut,A.M., Bonneau,R.H., Kierstead,T.D., Tevethia,M.J., Simmons,D.T. and Tevethi,S.S. Cytotoxic T lymphocyte escape variants, induced mutations, and synthetic peptides define a dominant H-2Kb-restricted determinant in simian virus 40 tumor antigen, *Virology.*, **208**: 159-172, 1995.
- 61 Srinivasan,A., McClellan,A.J., Vartikar,J., Marks,I., Cantalupo,P., Li,Y., Whyte,P., Rundell,K., Brodsky,J.L. and Pipas,J.M. The amino-terminal transforming region of simian virus 40 large T and small t antigens functions as a J domain, *Mol.Cell Biol.*, **17**: 4761-4773, 1997.
- 62 Garbi,N., Arnold,B., Gordon,S., Hammerling,G.J. and Ganss,R. CpG motifs as proinflammatory factors render autochthonous tumors permissive for infiltration and destruction, *J.Immunol.*, **172**: 5861-5869, 2004.
- 63 Klerk,C.P., Overmeer,R.M., Niers,T.M., Versteeg,H.H., Richel,D.J., Buckle,T., Van Noorden,C.J. and van Tellingen,O. Validity of bioluminescence measurements for noninvasive in vivo imaging of tumor load in small animals, *Biotechniques.*, **43**: 7-13, 30, 2007.
- 64 Miloud,T., Henrich,C. and Hammerling,G.J. Quantitative comparison of click beetle and firefly luciferases for in vivo bioluminescence imaging, *J.Biomed.Opt.*, **12**: 054018, 2007.
- 65 Steinman,R.M., Hawiger,D., Liu,K., Bonifaz,L., Bonnyay,D., Mahnke,K., Iyoda,T., Ravetch,J., Dhodapkar,M., Inaba,K. and Nussenzweig,M. Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance, *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **987**:15-25.: 15-25, 2003.
- 66 Steinman,R.M. Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation, *Mt.Sinai J.Med.*, **68**: 160-166, 2001.
- 67 Abbas,A.K. and Sharpe,A.H. Dendritic cells giveth and taketh away, *Nat.Immunol.*, **6**: 227-228, 2005.
- 68 Dubey,C., Croft,M. and Swain,S.L. Costimulatory requirements of naive CD4+ T cells. ICAM-1 or B7-1 can costimulate naive CD4 T cell activation but both are required for optimum response, *J.Immunol.*, **155**: 45-57, 1995.
- 69 Sallusto,F., Cella,M., Danieli,C. and Lanzavecchia,A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products, *J.Exp.Med.*, **182**: 389-400, 1995.
- 70 Steinman,R.M. and Swanson,J. The endocytic activity of dendritic cells, *J.Exp.Med.*, **182**: 283-288, 1995.
- 71 Stahl,P., Schlesinger,P.H., Sigardson,E., Rodman,J.S. and Lee,Y.C. Receptor-mediated pinocytosis of mannose glycoconjugates by macrophages: characterization and evidence for receptor recycling, *Cell.*, **19**: 207-215, 1980.

- 72 Jiang,W., Swiggard,W.J., Heufler,C., Peng,M., Mirza,A., Steinman,R.M. and Nussenzweig,M.C. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing, *Nature.*, 375: 151-155, 1995.
- 73 Mahnke,K., Guo,M., Lee,S., Sepulveda,H., Swain,S.L., Nussenzweig,M. and Steinman,R.M. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments, *J.Cell Biol.*, 151: 673-684, 2000.
- 74 Harris,N., Super,M., Rits,M., Chang,G. and Ezekowitz,R.A. Characterization of the murine macrophage mannose receptor: demonstration that the downregulation of receptor expression mediated by interferon-gamma occurs at the level of transcription, *Blood.*, 80: 2363-2373, 1992.
- 75 Taylor,M.E., Conary,J.T., Lennartz,M.R., Stahl,P.D. and Drickamer,K. Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains, *J.Biol.Chem.*, 265: 12156-12162, 1990.
- 76 Boskovic,J., Arnold,J.N., Stilion,R., Gordon,S., Sim,R.B., Rivera-Calzada,A., Wienke,D., Isacke,C.M., Martinez-Pomares,L. and Llorca,O. Structural model for the mannose receptor family uncovered by electron microscopy of Endo180 and the mannose receptor, *J.Biol.Chem.*, 281: 8780-8787, 2006.
- 77 Ishizaki,J., Hanasaki,K., Higashino,K., Kishino,J., Kikuchi,N., Ohara,O. and Arita,H. Molecular cloning of pancreatic group I phospholipase A2 receptor, *J.Biol.Chem.*, 269: 5897-5904, 1994.
- 78 Lambeau,G., Ancian,P., Barhanin,J. and Lazdunski,M. Cloning and expression of a membrane receptor for secretory phospholipases A2, *J.Biol.Chem.*, 269: 1575-1578, 1994.
- 79 Swiggard,W.J., Mirza,A., Nussenzweig,M.C. and Steinman,R.M. DEC-205, a 205-kDa protein abundant on mouse dendritic cells and thymic epithelium that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence, *Cell Immunol.*, 165: 302-311, 1995.
- 80 Ezekowitz,R.A., Sastry,K., Bailly,P. and Warner,A. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells, *J.Exp.Med.*, 172: 1785-1794, 1990.
- 81 Iwasaki,A. and Medzhitov,R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses, *Nat.Immunol.*, 5: 987-995, 2004.
- 82 Taylor,M.E., Bezouska,K. and Drickamer,K. Contribution to ligand binding by multiple carbohydrate-recognition domains in the macrophage mannose receptor, *J.Biol.Chem.*, 267: 1719-1726, 1992.
- 83 Engering,A.J., Cella,M., Fluitsma,D., Brockhaus,M., Hoefsmit,E.C., Lanzavecchia,A. and Pieters,J. The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells, *Eur.J.Immunol.*, 27: 2417-2425, 1997.
- 84 Tan,M.C., Mommaas,A.M., Drijfhout,J.W., Jordens,R., Onderwater,J.J., Verwoerd,D., Mulder,A.A., van der Heiden,A.N., Scheidegger,D., Oomen,L.C., Ottenhoff,T.H., Tulp,A., Neefjes,J.J. and Koning,F. Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells, *Eur.J.Immunol.*, 27: 2426-2435, 1997.
- 85 Bonifaz,L., Bonnyay,D., Mahnke,K., Rivera,M., Nussenzweig,M.C. and Steinman,R.M. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state

- leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8⁺ T cell tolerance, *J.Exp.Med.*, **196**: 1627-1638, 2002.
- 86 Hawiger,D., Inaba,K., Dorsett,Y., Guo,M., Mahnke,K., Rivera,M., Ravetch,J.V., Steinman,R.M. and Nussenzweig,M.C. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo, *J.Exp.Med.*, **194**: 769-779, 2001.
- 87 Guermonprez,P., Saveanu,L., Kleijmeer,M., Davoust,J., Van Endert,P. and Amigorena,S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells, *Nature.*, **425**: 397-402, 2003.
- 88 Mahnke,K., Schmitt,E., Bonifaz,L., Enk,A.H. and Jonuleit,H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells, *Immunol.Cell Biol.*, **80**: 477-483, 2002.
- 89 Mahnke,K., Knop,J. and Enk,A.H. Induction of tolerogenic DCs: 'you are what you eat', *Trends Immunol.*, **24**: 646-651, 2003.
- 90 Mahnke,K., Qian,Y., Knop,J. and Enk,A.H. Dendritic cells, engineered to secrete a T-cell receptor mimic peptide, induce antigen-specific immunosuppression in vivo, *Nat.Biotechnol.*, **21**: 903-908, 2003.
- 91 Bonifaz,L.C., Bonnyay,D.P., Charalambous,A., Darguste,D.I., Fujii,S., Soares,H., Brimnes,M.K., Molledo,B., Moran,T.M. and Steinman,R.M. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination, *J.Exp.Med.*, **199**: 815-824, 2004.
- 92 Dudziak,D., Kamphorst,A.O., Heidkamp,G.F., Buchholz,V.R., Trumpfheller,C., Yamazaki,S., Cheong,C., Liu,K., Lee,H.W., Park,C.G., Steinman,R.M. and Nussenzweig,M.C. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo, *Science.*, **315**: 107-111, 2007.
- 93 Blander,J.M. and Medzhitov,R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells, *Nature.*, **440**: 808-812, 2006.
- 94 Andreakos,E., Sacre,S.M., Smith,C., Lundberg,A., Kiriakidis,S., Stonehouse,T., Monaco,C., Feldmann,M. and Foxwell,B.M. Distinct pathways of LPS-induced NF-kappa B activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP, *Blood.*, **103**: 2229-2237, 2004.
- 95 Warger,T., Osterloh,P., Rechtsteiner,G., Fassbender,M., Heib,V., Schmid,B., Schmitt,E., Schild,H. and Radsak,M.P. Synergistic activation of dendritic cells by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses in vivo, *Blood.*, **108**: 544-550, 2006.
- 96 Yamamoto,M., Sato,S., Mori,K., Hoshino,K., Takeuchi,O., Takeda,K. and Akira,S. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling, *J.Immunol.*, **169**: 6668-6672, 2002.
- 97 Yamamoto,M., Sato,S., Hemmi,H., Hoshino,K., Kaisho,T., Sanjo,H., Takeuchi,O., Sugiyama,M., Okabe,M., Takeda,K. and Akira,S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway, *Science.*, **301**: 640-643, 2003.
- 98 Horng,T., Barton,G.M. and Medzhitov,R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway, *Nat.Immunol.*, **2**: 835-841, 2001.
- 99 Horng,T., Barton,G.M., Flavell,R.A. and Medzhitov,R. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors, *Nature.*, **420**: 329-333, 2002.
- 100 Yamamoto,M., Sato,S., Hemmi,H., Sanjo,H., Uematsu,S., Kaisho,T., Hoshino,K., Takeuchi,O., Kobayashi,M., Fujita,T., Takeda,K. and Akira,S. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4, *Nature.*, **420**: 324-329, 2002.

- 101 Fitzgerald,K.A., Palsson-McDermott,E.M., Bowie,A.G., Jefferies,C.A., Mansell,A.S., Brady,G., Brint,E., Dunne,A., Gray,P., Harte,M.T., McMurray,D., Smith,D.E., Sims,J.E., Bird,T.A. and O'Neill,L.A. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction, *Nature.*, 413: 78-83, 2001.
- 102 Weighardt,H., Kaiser-Moore,S., Vabulas,R.M., Kirschning,C.J., Wagner,H. and Holzmann,B. Cutting edge: myeloid differentiation factor 88 deficiency improves resistance against sepsis caused by polymicrobial infection, *J.Immunol.*, 169: 2823-2827, 2002.
- 103 Napolitani,G., Rinaldi,A., Bertonni,F., Sallusto,F. and Lanzavecchia,A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells, *Nat.Immunol.*, 6: 769-776, 2005.
- 104 Skokos,D. and Nussenzweig,M.C. CD8- DCs induce IL-12-independent Th1 differentiation through Delta 4 Notch-like ligand in response to bacterial LPS, *J.Exp.Med.*, 204: 1525-1531, 2007.
- 105 Ahmad-Nejad,P., Hacker,H., Rutz,M., Bauer,S., Vabulas,R.M. and Wagner,H. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments, *Eur.J.Immunol.*, 32: 1958-1968, 2002.
- 106 Heit,A., Schmitz,F., O'Keeffe,M., Staib,C., Busch,D.H., Wagner,H. and Huster,K.M. Protective CD8 T cell immunity triggered by CpG-protein conjugates competes with the efficacy of live vaccines, *J.Immunol.*, 174: 4373-4380, 2005.
- 107 Maurer,T., Heit,A., Hochrein,H., Ampenberger,F., O'Keeffe,M., Bauer,S., Lipford,G.B., Vabulas,R.M. and Wagner,H. CpG-DNA aided cross-presentation of soluble antigens by dendritic cells, *Eur.J.Immunol.*, 32: 2356-2364, 2002.
- 108 Rutz,M., Metzger,J., Gellert,T., Lippa,P., Lipford,G.B., Wagner,H. and Bauer,S. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner, *Eur.J.Immunol.*, 34: 2541-2550, 2004.
- 109 Alexopoulou,L., Holt,A.C., Medzhitov,R. and Flavell,R.A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3, *Nature.*, 413: 732-738, 2001.
- 110 Hemmi,H., Kaisho,T., Takeuchi,O., Sato,S., Sanjo,H., Hoshino,K., Horiuchi,T., Tomizawa,H., Takeda,K. and Akira,S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway, *Nat.Immunol.*, 3: 196-200, 2002.
- 111 Hacker,H., Redecke,V., Blagoev,B., Kratchmarova,I., Hsu,L.C., Wang,G.G., Kamps,M.P., Raz,E., Wagner,H., Hacker,G., Mann,M. and Karin,M. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6, *Nature.*, 439: 204-207, 2006.
- 112 Kraal,G., Breel,M., Janse,M. and Bruin,G. Langerhans' cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody, *J.Exp.Med.*, 163: 981-997, 1986.
- 113 Steinman,R.M., Pack,M. and Inaba,K. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs, *Immunol.Rev.*, 156:25-37.: 25-37, 1997.
- 114 Witmer-Pack,M.D., Swiggard,W.J., Mirza,A., Inaba,K. and Steinman,R.M. Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. II. Expression in situ in lymphoid and nonlymphoid tissues, *Cell Immunol.*, 163: 157-162, 1995.
- 115 Boscardin,S.B., Hafalla,J.C., Masilamani,R.F., Kamphorst,A.O., Zebroski,H.A., Rai,U., Morrot,A., Zavala,F., Steinman,R.M., Nussenzweig,R.S. and Nussenzweig,M.C. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses, *J.Exp.Med.*, 203: 599-606, 2006.

-
- 116 Steinman,R.M. Dendritic cells and vaccines, *Proc.(Bayl.Univ Med.Cent.)*, *21*: 3-8, 2008.
- 117 Soares,H., Waechter,H., Glaichenhaus,N., Mougneau,E., Yagita,H., Mizenina,O., Dudziak,D., Nussenzweig,M.C. and Steinman,R.M. A subset of dendritic cells induces CD4+ T cells to produce IFN-gamma by an IL-12-independent but CD70-dependent mechanism in vivo, *J.Exp.Med.*, *204*: 1095-1106, 2007.
- 118 Trumpfheller,C., Finke,J.S., Lopez,C.B., Moran,T.M., Molledo,B., Soares,H., Huang,Y., Schlesinger,S.J., Park,C.G., Nussenzweig,M.C., Granelli-Piperno,A. and Steinman,R.M. Intensified and protective CD4+ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine, *J.Exp.Med.*, *203*: 607-617, 2006.
- 119 Bruder,D., Westendorf,A.M., Hansen,W., Prettin,S., Gruber,A.D., Qian,Y., von Boehmer,H., Mahnke,K. and Buer,J. On the edge of autoimmunity: T-cell stimulation by steady-state dendritic cells prevents autoimmune diabetes, *Diabetes*, *54*: 3395-3401, 2005.
- 120 Kretschmer,K., Apostolou,I., Hawiger,D., Khazaie,K., Nussenzweig,M.C. and von Boehmer,H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen, *Nat.Immunol.*, *6*: 1219-1227, 2005.
- 121 Mahnke,K., Qian,Y., Knop,J. and Enk,A.H. Induction of CD4+/CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells, *Blood*, *101*: 4862-4869, 2003.
- 122 Bozzacco,L., Trumpfheller,C., Siegal,F.P., Mehandru,S., Markowitz,M., Carrington,M., Nussenzweig,M.C., Piperno,A.G. and Steinman,R.M. DEC-205 receptor on dendritic cells mediates presentation of HIV gag protein to CD8+ T cells in a spectrum of human MHC I haplotypes, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *104*: 1289-1294, 2007.
- 123 Steinman,R.M. Dendritic cells: understanding immunogenicity, *Eur.J.Immunol.*, *37 Suppl 1*:S53-60.: S53-S60, 2007.
- 124 Porgador,A., Irvine,K.R., Iwasaki,A., Barber,B.H., Restifo,N.P. and Germain,R.N. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization, *J.Exp.Med.*, *188*: 1075-1082, 1998.
- 125 Steitz,J., Bruck,J., Lenz,J., Buchs,S. and Tuting,T. Peripheral CD8+ T cell tolerance against melanocytic self-antigens in the skin is regulated in two steps by CD4+ T cells and local inflammation: implications for the pathophysiology of vitiligo, *J.Invest Dermatol.*, *124*: 144-150, 2005.
- 126 Kaplan,J.M., Yu,Q., Piraino,S.T., Pennington,S.E., Shankara,S., Woodworth,L.A. and Roberts,B.L. Induction of antitumor immunity with dendritic cells transduced with adenovirus vector-encoding endogenous tumor-associated antigens, *J.Immunol.*, *163*: 699-707, 1999.
- 127 Overwijk,W.W., Surman,D.R., Tsung,K. and Restifo,N.P. Identification of a Kb-restricted CTL epitope of beta-galactosidase: potential use in development of immunization protocols for "self" antigens, *Methods*, *12*: 117-123, 1997.
- 128 Tuting,T., Steitz,J., Bruck,J., Gambotto,A., Steinbrink,K., DeLeo,A.B., Robbins,P., Knop,J. and Enk,A.H. Dendritic cell-based genetic immunization in mice with a recombinant adenovirus encoding murine TRP2 induces effective anti-melanoma immunity, *J.Gene Med.*, *1*: 400-406, 1999.
- 129 Bellone,M., Cantarella,D., Castiglioni,P., Crosti,M.C., Ronchetti,A., Moro,M., Garancini,M.P., Casorati,G. and Dellabona,P. Relevance of the tumor antigen in the validation of three vaccination strategies for melanoma, *J.Immunol.*, *165*: 2651-2656, 2000.
- 130 Mahnke,K., Schonfeld,K., Fondel,S., Ring,S., Karakhanova,S., Wiedemeyer,K., Bedke,T., Johnson,T.S., Storn,V., Schallenberg,S. and Enk,A.H. Depletion of CD4+CD25+ human

- regulatory T cells in vivo: kinetics of Treg depletion and alterations in immune functions in vivo and in vitro, *Int.J.Cancer.*, 120: 2723-2733, 2007.
- 131 Ossendorp,F., Mengede,E., Camps,M., Filius,R. and Melief,C.J. Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors, *J.Exp.Med.*, 187: 693-702, 1998.
- 132 Mylin,L.M., Schell,T.D., Roberts,D., Epler,M., Boesteanu,A., Collins,E.J., Frelinger,J.A., Joyce,S. and Tevethia,S.S. Quantitation of CD8(+) T-lymphocyte responses to multiple epitopes from simian virus 40 (SV40) large T antigen in C57BL/6 mice immunized with SV40, SV40 T-antigen-transformed cells, or vaccinia virus recombinants expressing full-length T antigen or epitope minigenes, *J.Virol.*, 74: 6922-6934, 2000.
- 133 Berzofsky,J.A., Ahlers,J.D. and Belyakov,I.M. Strategies for designing and optimizing new generation vaccines, *Nat.Rev.Immunol.*, 1: 209-219, 2001.
- 134 Pardoll,D.M. Spinning molecular immunology into successful immunotherapy, *Nat.Rev.Immunol.*, 2: 227-238, 2002.
- 135 Engelhard,V.H., Bullock,T.N., Colella,T.A., Sheasley,S.L. and Mullins,D.W. Antigens derived from melanocyte differentiation proteins: self-tolerance, autoimmunity, and use for cancer immunotherapy, *Immunol.Rev.*, 188:136-46.: 136-146, 2002.
- 136 Jaeger,E., Bernhard,H., Romero,P., Ringhoffer,M., Arand,M., Karbach,J., Ilseemann,C., Hagedorn,M. and Knuth,A. Generation of cytotoxic T-cell responses with synthetic melanoma-associated peptides in vivo: implications for tumor vaccines with melanoma-associated antigens, *Int.J.Cancer.*, 66: 162-169, 1996.
- 137 Butler,M., Morel,A.S., Jordan,W.J., Eren,E., Hue,S., Shrimpton,R.E. and Ritter,M.A. Altered expression and endocytic function of CD205 in human dendritic cells, and detection of a CD205-DCL-1 fusion protein upon dendritic cell maturation, *Immunology.*, 120: 362-371, 2007.
- 138 Guo,M., Gong,S., Maric,S., Misulovin,Z., Pack,M., Mahnke,K., Nussenzweig,M.C. and Steinman,R.M. A monoclonal antibody to the DEC-205 endocytosis receptor on human dendritic cells, *Hum.Immunol.*, 61: 729-738, 2000.
- 139 Buller,R.M., Holmes,K.L., Hugin,A., Frederickson,T.N. and Morse,H.C., III Induction of cytotoxic T-cell responses in vivo in the absence of CD4 helper cells, *Nature.*, 328: 77-79, 1987.
- 140 Rahemtulla,A., Fung-Leung,W.P., Schilham,M.W., Kundig,T.M., Sambhara,S.R., Narendran,A., Arabian,A., Wakeham,A., Paige,C.J., Zinkernagel,R.M. and . Normal development and function of CD8+ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4, *Nature.*, 353: 180-184, 1991.
- 141 Dudley,M.E., Wunderlich,J.R., Robbins,P.F., Yang,J.C., Hwu,P., Schwartzentruber,D.J., Topalian,S.L., Sherry,R., Restifo,N.P., Hübicki,A.M., Robinson,M.R., Raffeld,M., Duray,P., Seipp,C.A., Rogers-Freezer,L., Morton,K.E., Mavroukakis,S.A., White,D.E. and Rosenberg,S.A. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes, *Science.*, 298: 850-854, 2002.
- 142 Ho,W.Y., Yee,C. and Greenberg,P.D. Adoptive therapy with CD8(+) T cells: it may get by with a little help from its friends, *J.Clin.Invest.*, 110: 1415-1417, 2002.
- 143 Kobayashi,H., Song,Y., Hoon,D.S., Appella,E. and Celis,E. Tumor-reactive T helper lymphocytes recognize a promiscuous MAGE-A3 epitope presented by various major histocompatibility complex class II alleles, *Cancer Res.*, 61: 4773-4778, 2001.

-
- 144 Hung,K., Hayashi,R., Lafond-Walker,A., Lowenstein,C., Pardoll,D. and Levitsky,H. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response, *J.Exp.Med.*, **188**: 2357-2368, 1998.
- 145 Pardoll,D.M. Cancer vaccines, *Nat.Med.*, **4**: 525-531, 1998.
- 146 Dobrzanski,M.J., Reome,J.B. and Dutton,R.W. Immunopotentiating role of IFN-gamma in early and late stages of type 1 CD8 effector cell-mediated tumor rejection, *Clin.Immunol.*, **98**: 70-84, 2001.
- 147 Tough,D.F., Zhang,X. and Sprent,J. An IFN-gamma-dependent pathway controls stimulation of memory phenotype CD8+ T cell turnover in vivo by IL-12, IL-18, and IFN-gamma, *J.Immunol.*, **166**: 6007-6011, 2001.
- 148 Carter,L.L. and Dutton,R.W. Relative perforin- and Fas-mediated lysis in T1 and T2 CD8 effector populations, *J.Immunol.*, **155**: 1028-1031, 1995.
- 149 Sad,S., Kagi,D. and Mosmann,T.R. Perforin and Fas killing by CD8+ T cells limits their cytokine synthesis and proliferation, *J.Exp.Med.*, **184**: 1543-1547, 1996.
- 150 Jones,E., Dahm-Vicker,M., Simon,A.K., Green,A., Powrie,F., Cerundolo,V. and Gallimore,A. Depletion of CD25+ regulatory cells results in suppression of melanoma growth and induction of autoreactivity in mice, *Cancer Immun.*, **2**:1: 1, 2002.
- 151 Nagai,H., Horikawa,T., Hara,I., Fukunaga,A., Oniki,S., Oka,M., Nishigori,C. and Ichihashi,M. In vivo elimination of CD25+ regulatory T cells leads to tumor rejection of B16F10 melanoma, when combined with interleukin-12 gene transfer, *Exp.Dermatol.*, **13**: 613-620, 2004.
- 152 Bui,J.D., Uppaluri,R., Hsieh,C.S. and Schreiber,R.D. Comparative analysis of regulatory and effector T cells in progressively growing versus rejecting tumors of similar origins, *Cancer Res.*, **66**: 7301-7309, 2006.
- 153 Shimizu,J., Yamazaki,S. and Sakaguchi,S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity, *J.Immunol.*, **163**: 5211-5218, 1999.
- 154 Steitz,J., Bruck,J., Lenz,J., Knop,J. and Tuting,T. Depletion of CD25(+) CD4(+) T cells and treatment with tyrosinase-related protein 2-transduced dendritic cells enhance the interferon alpha-induced, CD8(+) T-cell-dependent immune defense of B16 melanoma, *Cancer Res.*, **61**: 8643-8646, 2001.
- 155 Charalambous,A., Oks,M., Nchinda,G., Yamazaki,S. and Steinman,R.M. Dendritic cell targeting of survivin protein in a xenogeneic form elicits strong CD4+ T cell immunity to mouse survivin, *J.Immunol.*, **177**: 8410-8421, 2006.
- 156 van Hall,T., van Bergen,J., van Veelen,P.A., Kraakman,M., Heukamp,L.C., Koning,F., Melief,C.J., Ossendorp,F. and Offringa,R. Identification of a novel tumor-specific CTL epitope presented by RMA, EL-4, and MBL-2 lymphomas reveals their common origin, *J.Immunol.*, **165**: 869-877, 2000.
- 157 Gabrilovich,D.I., Bronte,V., Chen,S.H., Colombo,M.P., Ochoa,A., Ostrand-Rosenberg,S. and Schreiber,H. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells, *Cancer Res.*, **67**: 425, 2007.
- 158 Nagaraj,S., Gupta,K., Pisarev,V., Kinarsky,L., Sherman,S., Kang,L., Herber,D.L., Schneck,J. and Gabrilovich,D.I. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer, *Nat.Med.*, **13**: 828-835, 2007.

- 159 Yang,R., Cai,Z., Zhang,Y., Yutzy,W.H., Roby,K.F. and Roden,R.B. CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells, *Cancer Res.*, 66: 6807-6815, 2006.
- 160 Berger,M., Bergers,G., Arnold,B., Hammerling,G.J. and Ganss,R. Regulator of G-protein signaling-5 induction in pericytes coincides with active vessel remodeling during neovascularization, *Blood.*, 105: 1094-1101, 2005.
- 161 Wingender,G., Garbi,N., Schumak,B., Jungerkes,F., Endl,E., von,B.D., Steitz,J., Striegler,J., Moldenhauer,G., Tuting,T., Heit,A., Huster,K.M., Takikawa,O., Akira,S., Busch,D.H., Wagner,H., Hammerling,G.J., Knolle,P.A. and Limmer,A. Systemic application of CpG-rich DNA suppresses adaptive T cell immunity via induction of IDO, *Eur.J.Immunol.*, 36: 12-20, 2006.
- 162 Chamow,S.M., Kogan,T.P., Peers,D.H., Hastings,R.C., Byrn,R.A. and Ashkenazi,A. Conjugation of soluble CD4 without loss of biological activity via a novel carbohydrate-directed cross-linking reagent, *J.Biol.Chem.*, 267: 15916-15922, 1992.
- 163 O'Shannessy,D.J., Dobersen,M.J. and Quarles,R.H. A novel procedure for labeling immunoglobulins by conjugation to oligosaccharide moieties, *Immunol.Lett.*, 8: 273-277, 1984.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Karsten Mahnke für die interessante Aufgabenstellung, den großen Freiraum bei der Durchführung der Arbeiten und die stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Seine wertvollen Anregungen haben maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Prof. Günter J. Hämmerling bedanke ich mich besonders für die hilfreichen wissenschaftlichen Ratschläge und für die Bereitschaft die Funktion des Gutachters zu übernehmen.

Herrn Prof. Alexander Enk danke ich für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen. Sie waren eine gute Übung für die Präsentation meiner Daten vor Fachpublikum.

Natalio Garbi (PhD) und PD Dr. Ruth Ganss sowie allen Mitarbeitern der Abteilung Molekulare Immunologie des Deutschen Krebsforschungszentrums möchte ich sehr herzlich für die sehr gute Kooperation und stete Hilfsbereitschaft danken.

Dr. Theron Johnson, Dr. Tanja Bedke, Leah Pretsch, Dr. Taku Fujimura, Michael Maas und Hans Urban danke ich für die Mithilfe bei verschiedenen Experimenten. Ihnen und allen übrigen Kollegen, Dr. Sabine Ring, Dr. Svetlana Karakhanova, Sonja Schallenberg, Kurt Schönfeld, Sabrina Schmitt, Marianne Thome, Stefan Meisel, und den ehemaligen Kollegen Dr. Sabine Fondel, Dr. Yingjie Qian, Anne Meinl, Monika Engstner, Rosa Eurich sowie Dr. Dirk Nettelbeck und seinen Mitarbeitern danke ich für die stets sehr gute Zusammenarbeit. Die große Hilfsbereitschaft, die sehr gute Kollegialität und Arbeitsatmosphäre werden mir stets in guter Erinnerung bleiben.

Nicht zuletzt will ich meiner Familie, allen voran meinen Eltern, recht herzlich danken, die mir meine Ausbildung ermöglicht und mich immer in jeder Hinsicht unterstützt haben.